

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA ADAMI

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DA SINVASTATINA
EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2013

MARINA ADAMI

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DA SINVASTATINA
EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS

Dissertação desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Michel Fleith Otuki
Co-Orientador: Daniela de Almeida Cabrini

CURITIBA

2013

Aos meus pais,

*Por me ensinarem a viver: “Um sonho que se
sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas
sonho que se sonha junto é realidade.”*

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Ao meu anjo da guarda que me protegeu nas madrugadas de laboratório e ao espírito santo por iluminar minhas idéias;

À minha mãe Ida, meu pai Raul, minhas irmãs Cris e Sá, meu cunhadinho Odi e minha sobrinha linda Ísis, pela força durante o período e pela compreensão da minha ausência nos encontros, celebrações e momentos importantes da nossa família, amo vocês;

Ao Bruno, meu amor, que me apoiou desde os dias de estudo para a prova até a data da defesa, suportou minhas tensões de mestrandia, os fins de semana de sol dentro de casa dedicados ao curso, e respeitou minha individualidade;

A todos os meus amigos queridos e tão importantes na minha vida, em especial à Carol, Nanda, Ruandro, Ivanna, Ver, Flávia, Gisela, Andrezza, Kauê, Claudinha, Aline, Kelly, Guto, Antônio e Riqui, que me apoiaram quando o cansaço surgia, com aquele abraço forte, sorriso no rosto, dizendo que tudo ia dar certo, com risadas e choros no corredor;

Aos meus orientadores Michel e Daniela, que me ofereceram a oportunidade de cursar o mestrado sem dedicação exclusiva e me guiaram para soluções durante as dificuldades, obrigada pela amizade e pelos ensinamentos de pesquisa e ética;

Ao meu grande amigo Bauru, que perdeu alguns sábados, domingos e feriados para me ensinar os métodos, compartilhar seu conhecimento e me fazer companhia durante os experimentos, obrigada por tudo, o teu apoio foi imprescindível para eu ter chegado até aqui;

Aos amigos do laboratório, em especial à Camila, Cíntia, Grazi, Fernanda, Bruna e Daniel, pela amizade sincera que construímos, pelas palavras queridas durante os experimentos, no intervalo do seminário, nos sábados de manhã, pela ajuda nos experimentos, conversas embaixo da árvore, risadas nos churrascos, sermões quando precisava, enfim, por todos os momentos legais, adoro muito vocês;

Ao pessoal da área de Avaliação de Produtos, que aguentou meu mau humor nas manhãs após as madrugadas em claro e compreendeu minhas ausências;

Aos camundongos, pois sem eles os resultados não existiriam.

*“Todo o nosso conhecimento
se inicia com sentimentos.”*

Leonardo da Vinci.

RESUMO

As estatinas representam uma classe de drogas que efetivamente reduz o nível de colesterol e possui efeitos pleiotrópicos como atividade imunomodulatória e anti-inflamatória. O objetivo deste trabalho é investigar o efeito tópico da sinvastatina em modelos de inflamação agudo e crônico em camundongos. A inflamação foi induzida pela aplicação tópica de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). No modelo agudo, o edema de orelha foi avaliado 6 h após a aplicação de TPA (2,5 µg/orelha). O processo crônico foi estabelecido pela aplicação múltipla de TPA (2,0 µg/orelha) durante 9 dias alternados, e o edema foi mensurado diariamente. O tratamento tópico com sinvastatina em acetona (0,24 – 2,40 µM) ou em pomada (1% e 3%), dexametasona em acetona (0,13 µM) ou em pomada (0,5%), e veículo (pomada) foi realizado após a aplicação de TPA em avaliações agudas e iniciou no 5º dia de experimento nas avaliações crônicas. Ao final dos experimentos, amostras das orelhas foram coletadas, pesadas e preparadas para análise histológica e atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO). No modelo agudo, a aplicação de sinvastatina em acetona reduziu o edema de forma dose dependente [DI₅₀ de 0,47 (0,22 – 1,13) µM], e a atividade da MPO (40 a 39%). Em pomada, as concentrações de sinvastatina 1% e 3%, impediu a formação do edema em 40 ± 10% e 54 ± 11%, respectivamente. Já no modelo crônico, apenas a pomada de sinvastatina a 1% foi capaz de reduzir o edema (25 ± 11%) e o peso da orelha (15 ± 1%). A análise histológica do modelo agudo evidenciou a redução do edema e da infiltração leucocitária. Já nas micrografias do modelo crônico foi observado a redução do edema e espessura da epiderme (45 ± 2%) na utilização da sinvastatina 1% em pomada, no entanto, efeitos opostos foram observados após a aplicação da pomada de sinvastatina 3%. Em todos os métodos apresentados, a dexametasona foi capaz de inibir os parâmetros avaliados. Os resultados indicam atividade anti-inflamatória da sinvastatina quando aplicada topicamente em ambos os modelos inflamatórios, sendo assim, a pomada de sinvastatina 1% demonstrou ser uma formulação efetiva.

Palavras-chave: Sinvastatina. Pomada. Pele. Anti-inflamatório. TPA.

ABSTRACT

Statins represent a class of drugs that effectively lowers cholesterol, however they have shown to possess also pleiotropic effects like immunomodulatory and anti-inflammatory effects. Thus, the aim of this study was to investigate the activity of simvastatin in acute and chronic inflammatory models by topical treatment. Skin inflammation was induced by topical application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). In the acute model, ear oedema was evaluated 6 h after TPA (2.5 µg/ear). The chronic inflammatory process was established by multiple applications of TPA (2.0 µg/ear) for nine alternate days, and the oedema was measured daily. Topical treatment with simvastatin in acetone (0.24 – 2.40 µM) or ointment preparation (1% and 3%), dexamethasone in acetone (0.13 µM) or in ointment (0.5%), and vehicle (ointment) was carried after TPA application on acute evaluations and started at 5th day of experiment on chronic evaluations. At the end of the experiments, ear samples were collected, weighted and prepared to histological analysis and myeloperoxidase enzymatic activity (MPO). In the acute model, simvastatin application in acetone avoided the ear oedema in a dose dependent manner [ID₅₀ of 0.47 (0.22 – 1.13) µM], and the MPO activity (40 to 39%). In ointment, simvastatin 1% and 3%, avoided the oedema formation in 40 ± 10% e 54 ± 11%. In chronic model, just the simvastatin 1% in ointment was able to reduce the oedema (25 ± 11%) and the ear weight (15 ± 1%). Histological analysis in acute model revealed the oedema and cell infiltration reduction. On chronic model, histopathological micrographs presented the ear odema and epidermal thickness (45 ± 2%) reduction after usage of simvastatin 1% in ointment, otherwise, it was observed that simvastatin 3% in ointment caused opposite effects. In whole methods, dexamethasone presented as able to inhibit the evaluated parameters. Results indicates anti-inflammatory effects of simvastatin in both models, acute and chronic.

Key-words: Simvastatin. Ointment. Skin. Anti-inflammatory. TPA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	O MECANISMO METABÓLICO DO MEVALONATO E DO COLESTEROL	16
FIGURA 2 -	ESTRUTURA DA PELE HUMANA ADULTA	19
FIGURA 3 -	INTERFACE ENTRE ESTRATO GRANULOSO E ESTRATO CÓRNEO, O CONTEÚDO DOS CORPOS LAMELARES É LIBERADO PARA A INTERFACE FORMANDO A BICAMADA LIPÍDICA.....	22
FIGURA 4 -	SISTEMA IMUNE CUTÂNEO	26
FIGURA 5 -	EFEITO DA SINVASTATINA EM ACETONA NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR APLICAÇÃO ÚNICA DE TPA.....	40
FIGURA 6 -	EFEITO DA SINVASTATINA EM ACETONA NA ATIVIDADE DA MPO	41
FIGURA 7 -	ANÁLISE HISTOLÓGICA APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM ACETONA NO MODELO AGUDO	42
FIGURA 8 -	CONTAGEM DE LEUCÓCITOS APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM ACETONA NO MODELO AGUDO	43
FIGURA 9 -	SELEÇÃO DO VEÍCULO MEDIANTE ANÁLISE DO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA	45
FIGURA 10 -	EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA	46
FIGURA 11 -	EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NA ATIVIDADE DA MPO NO MODELO AGUDO INDUZIDO POR TPA.....	47
FIGURA 12 -	EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NO EDEMA DE ORELHA CRÔNICO INDUZIDO POR TPA.....	49
FIGURA 13 -	EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NO PESO DA ORELHA NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO POR TPA.....	50
FIGURA 14 -	EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NA ATIVIDADE DE MPO NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO POR TPA	51
FIGURA 15 -	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELAS POMADAS DE SINVASTATINA NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO POR TPA.....	53

FIGURA 16 -	EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE SINVASTATINA EM POMADA NA ESPESSURA DA EPIDERME NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO POR TPA.....	54
-------------	---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DAS EMULSÕES O/A	35
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DAS POMADAS.....	36
TABELA 3 - RESULTADOS DO TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO E PH DAS EMULSÕES	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA - acetil coenzima A
AMP - padrões moleculares associados
ASC - proteína adaptadora
BHT - Hidroxitolueno butilado
CCL - receptor de quimiocina
CD2 - cluster de diferenciação 2
CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal
CXCL - receptor de quimiocina
DAMP - padrões moleculares associados aos endógenos perigosos
DCA - dermatite de contato alérgica
DCI - dermatite de contato irritativa
Dexa - Dexametasona
DMF - N,N-dimetilformamida
Emulsão o/a – emulsão óleo em água
FPP - isoprenóides farnesil pirofosfato
GGPP - geranyl geranyl pirofosfato
GM-CSF - fator estimulante da colônia de granulócitos e macrófagos
HDL - lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA - hidroximetilglutaril-coenzima A
HTAB - Hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ - interferon- γ
IL - interleucina
JAM-1 - molécula-1 de adesão juncional
K1 - queratina 1
K10 - queratina 10
LFA-1 - antígeno associado ao linfócito-1
LPS - lipopolissacarídeos
MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos-1
MHC - complexo de histocompatibilidade principal

MMP-9 - enzima de matriz metaloproteinase-9
MUPP-1 - proteína-1 multi-PDZ
NK - natural killer
NLR - repetições ricas em leucina
PAMP -padrões moleculares associados ao patógeno
PASI - índice de severidade e área da psoríase
PBS - salina tamponada com fosfato de sódio
PCR - proteína C reativa
PKC - proteína quinase C
SALT - tecido linfóide associado à pele
TEWL - perda de água transepidermal
TGF- β - fator de crescimento tumoral- β
TLR – receptor toll-like
TMB - Tetrametilbenzidina
TNF - fator de necrose tumoral
TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 SINVASTATINA.....	15
1.2 FISILOGIA DA PELE	18
1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO CUTÂNEO	25
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVOS GERAIS	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ANIMAIS E MANUTENÇÃO	33
4.2 DROGAS E REAGENTES	33
4.3 DESENVOLVIMENTO DOS VEÍCULOS.....	34
4.3.1 Preparação emulsão o/a	34
4.3.2 Preparação pomada.....	35
4.4 MODELO DE EDEMA DE ORELHA	36
4.4.1 Avaliação do Edema	36
4.4.2 Aplicação tópica de TPA	37
4.4.3 Avaliação do Edema Induzido pela Aplicação Tópica de TPA	37
4.4.4 Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Múltipla de TPA	38
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	38
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	39
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5 RESULTADOS	40
5.1 EFEITO DA SINVASTATINA EM ACETONA NO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA.....	40
5.2 EFEITO DA SINVASTATINA EM ACETONA NA ATIVIDADE DA MPO NO MODELO AGUDO INDUZIDO POR TPA.....	41
5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM ACETONA NO MODELO AGUDO.....	42
5.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS VEÍCULOS DESENVOLVIDOS	43

5.5 SELEÇÃO DO VEÍCULO MEDIANTE ANÁLISE DO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA.....	44
5.6 EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA.....	45
5.7 EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NA ATIVIDADE DA MPO NO MODELO AGUDO INDUZIDO POR TPA.....	46
5.8 EFEITO DA SINVASTATINA NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA CRÔNICO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA.....	47
5.9 EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NA ATIVIDADE DA MPO NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA.....	50
5.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM POMADA NO MODELO CRÔNICO	52
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 SINVASTATINA

O desenvolvimento das estatinas como inibidoras de hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) ocorreu em 1971 por Endo e Kuroda, com a obtenção da mevastatina e lovastatina, as primeiras moléculas da classe utilizadas na clínica. As estatinas foram obtidas do metabolismo fúngico, sendo a primeira delas o citrino originado do fungo *Pythium ultimum*, em seguida foi desenvolvida a mevastatina através do *Penicillium citrinum*, e finalmente isolaram a lovastatina do *Aspergillus terreus*. Na década de 80, foi comprovado que essa classe de drogas reduzia o nível de colesterol do tipo lipoproteína de baixa densidade (LDL) mediante o bloqueio feito na biossíntese de colesterol (VEILLARD; MACH, 2002; ENDO, 1992).

Após a descoberta da lovastatina e mevastatina, houve o desenvolvimento de outras drogas da classe das estatinas, entre elas a sinvastatina, derivada da fermentação fúngica (FIGURA 1), conferindo maior afinidade com a enzima quando comparada às moléculas naturais. As estatinas comercializadas atualmente além da sinvastatina são a atorvastatina, fluvastatina, lovastatina e pravastatina, sendo a sinvastatina duas vezes mais potente que a pravastatina e lovastatina, enquanto a mevastatina é a menos potente (VEILLARD; MACH, 2002).

As estatinas diferem quanto à solubilidade, devido a sua lipofilicidade, a sinvastatina possui difusão passiva nas membranas celulares de forma não seletiva enquanto a pravastatina é hidrossolúvel e por isso não consegue atravessar as membranas facilmente (VEILLARD; MACH, 2002).

As estatinas inibem de forma competitiva a enzima HMG-CoA redutase, responsável pela primeira etapa na síntese de esteróis (FIGURA 1) (NEZIC *et al.*, 2009; VEILLARD; MACH, 2002). A inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase promove duas respostas fisiológicas, além da redução no colesterol plasmático, também favorece o aumento do número de receptores hepáticos para LDL, como o fígado é responsável pela remoção de LDL plasmático pelo mecanismo de receptores, os níveis de colesterol também reduzem dramaticamente (VEILLARD; MACH, 2002).

mensageiros intracelulares (NAMAZI, 2004). O GGPP promove a proliferação das células Th1, enquanto o GGPP e o FPP promovem a diferenciação das células Th1. Leung *et al.* (2003) demonstraram que o tratamento de camundongos com sinvastatina foi capaz de reverter a artrite inflamatória nos animais e Kanda *et al.* (2007) fizeram um estudo com um grupo de pacientes diagnosticados com artrite reumatóide, os quais foram tratados durante 12 semanas com sinvastatina e apresentaram melhora nos sintomas clínicos, com redução de proteína C reativa (PCR), sedimentação eritrocitária, e as razões Th1/Th2 e CD4/CD8. Esses resultados sugerem que outras condições inflamatórias com aumento na razão Th1/Th2 podem ser tratadas com baixas doses de estatinas (EGESI *et al.*, 2010; KANDA *et al.*, 2003; LEUNG *et al.* 2003).

A inibição da migração leucocitária causada pelas estatinas foi publicada por diversos autores. As estatinas se ligam diretamente ao antígeno associado ao linfócito-1 (LFA-1) e previne a ligação na molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), impedindo a adesão e ativação da célula T (EGESI *et al.*, 2010; KWAK *et al.*, 2000). Outra forma de inibir a migração é através da redução na atividade da enzima de matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), enzima secretada para ativar as células mononucleares que facilitam a transmigração leucocitária pela barreira hematoencefálica (EGESI *et al.*, 2010; TURNER *et al.*, 2005). Devaraj e colaboradores (2006) demonstraram que a sinvastatina é capaz de reduzir o nível de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). Com o impedimento de migração leucocitária, há uma prevenção no deslocamento das células T até os sítios auto-imunes que possuem expressão aumentada de ICAM-1 como nos folículos em pacientes com alopecia areata e nos sítios com perda de melanócitos em pacientes de vitiligo (EGESI *et al.*, 2010; VAN DEN WIJNGAARD *et al.*, 2000; NICKOLOFF; GRIFFITHS, 1991).

As estatinas inibem também a captação, processamento e apresentação dos antígenos em linfócitos B e células dendríticas. Isso porque as proteínas G pequenas Rho e Ras requerem mevalonato para fazer a prenilação na membrana plasmática, e com a inibição do mevalonato pelas estatinas, esse processo não ocorre (EGESI *et al.*, 2010; GHITTONI *et al.*, 2006).

Psoríase é uma clássica condição baseada em Th1, onde as células dendríticas dérmicas produzem células T em Th1/Th17 e estimulam a síntese de interleucina-17 (IL-17) e interferon- γ (IFN- γ). As estatinas podem alterar o balanço Th1/Th2, assim como suprimir IL-17 e IFN- γ (EGESI *et al.*, 2010; KRYCZEK *et al.*, 2008). A IL-17 estimula a produção das citocinas IL-6, IL-1 β , fator de crescimento tumoral- β (TGF- β), fator de necrose tumoral- β (TNF- β) e também quimiocinas e prostaglandinas de fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e macrófagos (EGESI *et al.*, 2010). Estudo com humanos demonstraram que o

tratamento com sinvastatina oral durante 8 semanas promove a redução das placas psoriáticas, de acordo com o índice de severidade e área da psoríase (PASI) (EGESI *et al.*, 2010; GLYNN *et al.*, 2008).

1.2 FISIOLOGIA DA PELE

Para avaliar o processo inflamatório tópico e analisar os possíveis efeitos da sinvastatina na pele, é necessário compreender a fisiologia cutânea e quais são os alvos que a sinvastatina pode interagir.

A pele de um indivíduo adulto mede aproximadamente 2 m² e pesa 5 a 6 kg, o que corresponde a 6% da massa corporal. Sua principal função é formar uma barreira entre o organismo e o ambiente externo e é designada a protegê-lo das agressões mecânicas, químicas, microbianas, térmicas, eletrolíticas e de umidade, além da presença do sistema pigmentário que protege a pele dos raios ultravioletas (TOBIN, 2005; FREINKEL; WOODLEY, 2001).

Para a homeostase, o tecido é composto de barreiras físicas, químicas/bioquímicas e imunológica adaptativa. As células, suas junções e o citoesqueleto protéico constituem a estrutura física, enquanto os lipídios, ácidos, enzimas hidrolíticas e peptídeos antimicrobianos compõem a proteção química/bioquímica, enquanto a barreira imunológica possui constituintes humorais e celulares do sistema imune (PROKSCH *et al.*, 2008).

O tecido cutâneo possui células-tronco residentes no folículo piloso, epiderme interfolicular e glândula sebácea, as quais originam células com potencial de diferenciação, o que contribui para o reparo e manutenção do tecido epitelial em virtude do seu grande potencial de renovação (YAN; OWENS, 2008; OWENS; WATT, 2003; LAJTHA, 1979). O equilíbrio entre diferenciação e proliferação é regulado por diversos sinais intracelulares e extracelulares, sinalizados entre os queratinócitos e outras células epidérmicas e dérmicas, mediante fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão (YAN; OWENS, 2008).

A pele possui duas camadas, a epiderme e a derme, a epiderme é formada de um epitélio estratificado e queratinizado, não vascularizado, enquanto a derme contém fibroblastos que sintetizam componentes elásticos e fibrosos, sistema vascular, neural, linfático e apêndices (TOBIN, 2005; FREINKEL; WOODLEY, 2001).

A epiderme (FIGURA 2) é constituída por quatro estratos celulares diferenciados a partir da membrana basal: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (TOBIN, 2005). O estrato basal ou germinativo está ancorado na membrana basal, a qual separa a epiderme da derme, e possui células de Merkel, melanócitos e queratinócitos com propriedades de células-tronco. É uma região proliferativa, na qual células indiferenciadas tornam-se diferenciadas. Os queratinócitos do estrato basal se transformam em corneócitos (células do estrato córneo) em aproximadamente 30 dias. A divisão celular acontece através de diferenciação e maturação, e cada camada da epiderme apresenta produtos específicos da expressão gênica necessários para fazer o queratinócito seguir para o próximo estágio. As células lesionadas podem ser eliminadas pelo processo normal de descamação ou por apoptose em caso de dano químico, mecânico, imunológico ou radiação UV. O balanço entre os fatores pró- e anti-apoptóticos e os fatores pró-mitóticos e pró-diferenciação no *turnover* celular favorece a homeostasia e consequentemente a saúde da pele (TOBIN, 2005).

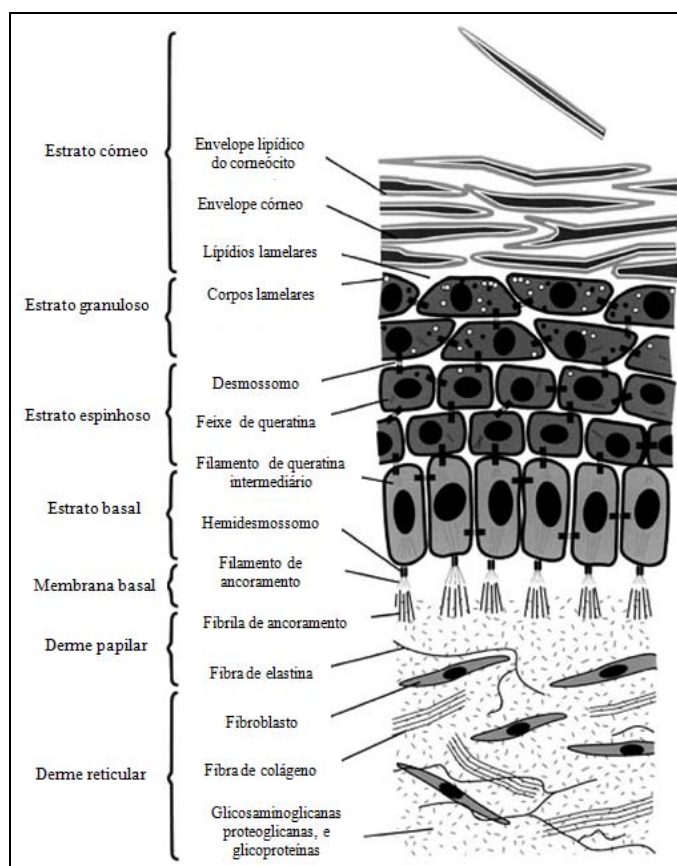


FIGURA 2 - ESTRUTURA DA PELE HUMANA ADULTA
 FONTE: Adaptação Hardman e Byrne (2006)

A pele é constituída de duas camadas, derme e epiderme. A epiderme pode ser subdividida em quatro estratos, cada um representando um estágio específico de diferenciação.

As células sensoriais de Merkel expressam diversas proteínas neuronais, são mecanoreceptoras e fazem a discriminação tátil de formas e texturas em resposta ao estímulo da luz (MARICICH *et al.*, 2009). Os melanócitos são células especializadas em sintetizar melanina e transportá-la aos queratinócitos do estrato espinhoso via a transferência de melanossomos, organelas onde a melanina é sintetizada e armazenada. Além da sua função na coloração da pele, a melanina é responsável pela proteção ao DNA frente à radiação UV, a partir do envoltório que os grânulos formam no núcleo dos queratinócitos, absorvendo e refletindo a radiação. A absorção máxima da melanina ocorre na faixa eletromagnética da luz (UVB – UVA) e decai quando se aproxima da luz visível (PARK *et al.*, 2009; 2007; NORDLUND *et al.*, 2002).

O estrato espinhoso contém 8-10 camadas de queratinócitos com formato poligonal originados no estrato basal, onde ocorre o início da síntese de queratinas que não eram presentes no estrato basal. Ainda no estrato espinhoso, encontram-se as células de Langerhans (LC) apresentadoras de antígenos, também conhecidas como sentinelas do epitélio (TOBIN, 2005).

O estrato granuloso possui 3 a 5 camadas de queratinócitos contendo grânulos de queratohialina, que por esse motivo são chamados de granulócitos, são células indivisíveis, achatadas e conforme migram para a superfície suas organelas e núcleo sofrem quebra, além da sua membrana tornar-se impermeável (TOBIN, 2005). Enquanto a bioquímica de diferenciação entre o estrato basal e estrato espinhoso é dependente de Ca^{2+} , entre o espinhoso e o granuloso ocorre a supressão da expressão gênica das queratinas 1 e 10 (K1 e K10) via proteína quinase C. A característica mais proeminente desse estrato são os grânulos ricos em proteínas e lipídios, chamados grânulos de queratohialina, contendo profilagrina, irregulares, que coalescem ao chegar no estrato granuloso. Durante a maturação dos queratinócitos, os grânulos do estrato granuloso dispersam no estrato córneo através da desfosforilação e subsequente maturação da filagrina via proteólise (TOBIN, 2005; DLUGOSZ; YUSPA, 1993; MANABE; O'GUIN, 1992).

As células epidérmicas possuem junções celulares que conectam as células vizinhas, separam a membrana basolateral da apical e controlam a passagem de moléculas pela via paracelular de penetração. É possível identificar diversas proteínas de junção, entre elas a ocludina, claudinas 1, 4 e 7, molécula-1 de adesão juncional (JAM-1), proteína 1 de zônula de

oclusão e proteína-1 multi-PDZ (MUPP-1) (PROKSCH *et al.*, 2008; BRANDNER *et al.*, 2006; BRANDNER; PROKSCH, 2006). Em alguns distúrbios que afetam a função da barreira cutânea como na psoríase e ictiose vulgar, as proteínas de junção ocludina e claudina 4, formadas apenas na camada granulosa e camada espinhosa superior, são encontradas nas camadas mais profundas, ocasionando aumento da TEWL (PROKSCH *et al.*, 2008; BRANDNER; PROKSCH, 2006; BRANDNER *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2001).

O estrato córneo contém aproximadamente 15-30 camadas de corneócitos, células não viáveis, porém metabolicamente ativas, é a primeira barreira da pele, situada na superfície e em contato com a região externa do organismo (MADISON, 2003; TOBIN, 2005). Apesar de o estrato córneo ser representado metaforicamente pelo modelo de “tijolos e cimento”, onde as células são os tijolos e o complexo de lipídios é o cimento, ele é complexo e não estático. Este modelo foi revisado e atualmente o estrato córneo é caracterizado como metabolicamente ativo, com múltiplas atividades catalíticas nos compartimentos citosólicos, da membrana plasmática e do envelope córneo. O estrato córneo regula diversas funções, entre elas, a formação da barreira e sua permeabilidade, descamação, integridade mecânica e sua manutenção e a geração de umectantes ativos para a hidratação. Esse estrato é também adaptativo, promove a sinalização de citocinas em resposta às perturbações externas como alterações na umidade ambiental, em que ocorre modulação da permeabilidade e regulação da cinética de células epidérmicas e até o início de um processo inflamatório (ELIAS; FEINGOLD, 2006). As células dessa região são chamadas de corneócitos, são anucleadas, achatadas, constituídas de filamentos de queratina e filagrina, os quais são envolvidos por um envelope córneo contendo proteínas no estado *cross-link*, embebidas em um manto de lipídios apolares com estrutura lamelar (PROKSCH *et al.*, 2008).

A filagrina e queratina constituem 80-90% das proteínas presentes na epiderme, sendo que a filagrina promove a condensação e compactação da queratina devido às interações protéicas, transformando os corneócitos em células achatadas (PROKSCH *et al.*, 2008; PALMER *et al.*, 2006; ROOP, 1995; NEMES; STEINERT, 1999). A importância da filagrina na homeostase da barreira cutânea pode ser observada nos casos de ictiose vulgar e dermatite atópica em que a expressão dessa proteína encontra-se aumentada (PROKSCH *et al.*, 2008; PALMER *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006; IRVINE; MCLEAN, 2006).

O envelope córneo fornece a proteção biomecânica a partir da sua estrutura polimérica resistente composta de proteínas e lipídios, localizado abaixo da membrana citoplasmática do corneócito e envolvendo-o externamente. As proteínas do envelope incluem a involucrina, loricrina, trichohialina e uma classe de proteínas pequenas ricas em prolina, as

quais são ligadas por pontes dissulfeto e de isopeptídeos, ambas as pontes formadas por transglutaminases (PROKSCH *et al.*, 2008; CANDI *et al.*, 2005; NEMES; STEINERT, 1999). Foi encontrado que mutações na transglutaminase 1 de humanos promove defeitos na barreira cutânea causando ictiose lamelar (PROKSCH *et al.*, 2008; HUBER *et al.*, 1995).

Os lipídios do envelope córneo são formados por corpos lamelares (FIGURA 3) originados no complexo de Golgi das células da camada espinhosa superior e granulosa, constituídos de lipídios polares, glicoesfingolipídios, fosfolipídios e enzimas catabólicas. Quando ocorre uma sinalização como o aumento de cálcio, os corpos lamelares são transportados por vesículas tubulares e sofrem fusão com a membrana dos granulócitos para liberar seu conteúdo via exocitose para os espaços intercorneocitáticos. Na superfície dos corneócitos, os lipídios são organizados paralelamente às células e arranjados em estrutura lamelar, formando uma bicamada lipídica, a qual, juntamente com os corneodesmossomos (desmossomos dos corneócitos) conferem adesão e promovem proteção química, mecânica e impermeabilidade à água (PROKSCH *et al.*, 2008; OREN *et al.*, 2003; DOWNING *et al.*, 1987). Os lipídios polares são convertidos em não polares, os glicoesfingolipídios hidrolisam e geram ceramidas e os fosfolipídios são transformados em ácidos graxos livres e água. As maiores classes de lipídios do estrato córneo são as ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol (PROKSCH *et al.*, 2008; DOWNING *et al.*, 1987).

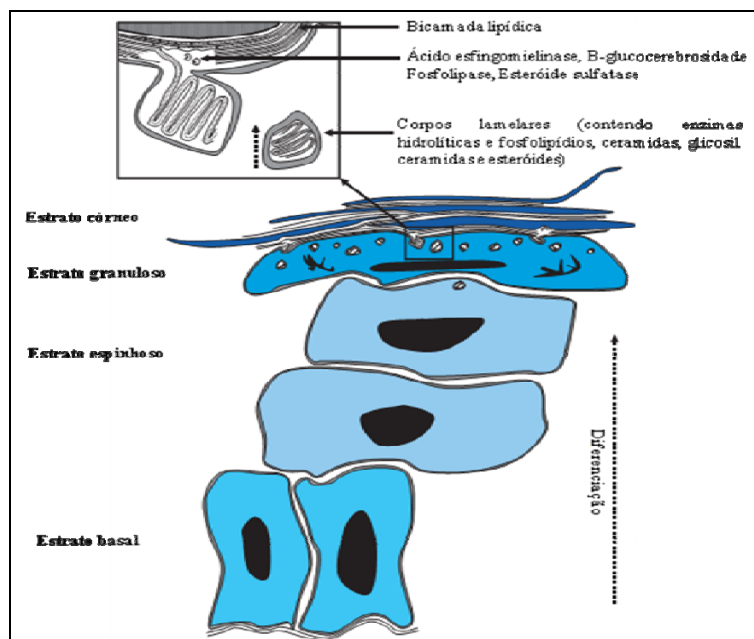


FIGURA 3 - INTERFACE ENTRE ESTRATO GRANULOSO E ESTRATO CÓRNEO, O CONTEÚDO DOS CORPOS LAMELARES É LIBERADO PARA A INTERFACE FORMANDO A BICAMADA LIPÍDICA

FONTE: Adaptação Proksch *et al.* (2008)

As ceramidas consistem de longa cadeia carbônica com uma amida ligada ao ácido graxo. No estrato córneo humano há nove classes de ceramidas, e a enzima limitante para a sua síntese é a serina palmitoil-CoA transferase, a qual encontra-se aumentada em situações de barreira cutânea danificada (JUNGERSTED *et al.*, 2008; WARTEWIG; NEUBERT, 2007; PROKSCH *et al.*, 1993). As ceramidas, em especial a classe 1, parece ter papel importante na organização dos lipídios do estrato córneo em fase ortorrômica (JUNGERSTED *et al.*, 2008; BOUWSTRA *et al.*, 2001; SCHREINER *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos são responsáveis pelo pH ácido (4,0 – 5,5) da superfície do estrato córneo (JUNGERSTED *et al.*, 2008; WICKETT; VISSCHER, 2006) e, juntamente com o colesterol sulfato, são os únicos lipídios do estrato córneo com cabeça ionizada/carregada, necessários para a formação da bicamada lipídica (JUNGERSTED *et al.*, 2008; WERTZ, 1992). São sintetizados pela enzima acetil-CoA carboxilase que catalisa a carboxilação da acetil-CoA em malonil-CoA, reação que aumenta quando ocorre um rompimento da barreira cutânea, devido ao acréscimo nos níveis de RNA_m para a enzima (JUNGERSTED *et al.*, 2008; HARRIS *et al.*, 1997).

Outro lipídio importante para a barreira cutânea é o colesterol, cuja síntese ocorre nos tecidos periféricos e no fígado, seu maior precursor é a molécula acetil coenzima A (acetil-CoA), derivada da oxidação mitocondrial e que quando transportada para o citoplasma transforma-se em hidroximetil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA). O substrato HMG-CoA sofre ação enzimática HMG-CoA redutase para produzir o mevalonato (TOUTOUZAS *et al.*, 2010; OLOFSSON *et al.*, 2000). A etapa limitante na formação do colesterol é a formação do mevalonato a partir da enzima HMG-CoA redutase, e assim como outras enzimas, a HMG-CoA também se encontra aumentada quando a barreira cutânea está danificada (JUNGERSTED *et al.*, 2008; HARRIS *et al.*, 1998; 1997).

No estrato basal da epiderme há receptores da classe B tipo 1 na superfície celular, são sequestradores de LDL, fazem o intermédio para a captação de colesterol proveniente da circulação sanguínea. Em caso de rompimento de barreira, ocorre um aumento na expressão desses receptores para aumentar a captação do colesterol e auxiliar na reparação da barreira (JUNGERSTED *et al.*, 2008; TSURUOKA *et al.*, 2002). Os receptores da classe B tipo 1 também são encontrados nas camadas suprabasais, em queratinócitos na fase de diferenciação, porém em menor quantidade e apenas intracelular (JUNGERSTED *et al.*, 2008). Além do colesterol hepático, e da captação celular do colesterol pelo tecido cutâneo, os queratinócitos também são capazes de sintetizá-lo, para ser utilizado durante a diferenciação e proliferação celular, além da transferência feita do tecido periférico para o sistema circulatório, mediante

partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL), processo conhecido como “transporte de colesterol reverso” (TOUTOUZAS *et al.*, 2010; BARTER *et al.*, 2003).

A derme é altamente vascularizada, por isso fornece o suporte de nutrientes para a epiderme, além de realizar a termorregulação do organismo. As células dessa camada são fundamentais para os processos inflamatórios e cicatriciais (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007). Esta camada pode ser dividida em região papilar (superior) e região reticular (inferior), as quais diferem conforme número de células, componentes do tecido conectivo, vascularização e nervos. A derme papilar é mais superficial e frouxa, suas fibras de colágeno de elastina são pouco organizadas e finas, enquanto a derme reticular é mais profunda e densa, possui fibras elásticas espessas e firmemente entrelaçadas com fibras de colágeno grossas e bem organizadas (SORRELL; CAPLAN, 2004; GARTNER; HIATT, 1999).

Apesar do seu grande volume, a derme possui menor quantidade de células quando comparada à epiderme, e maior volume de matriz extracelular amorfa (mistura complexa de macromoléculas bioativas) e fibrosa com apêndices cutâneos intercalados, nervos, vasos, receptores e células dérmicas. Além das células imunes residentes como macrófagos e mastócitos, a derme possui como célula principal o fibroblasto, que sintetiza e degrada a matriz extracelular (TOBIN, 2005; BRUCKER-TUDERMAN, 2003; CHANG *et al.*, 2002).

O material extracelular amorfo é formado de ácido hialurônico, proteoglicanas, glicoproteínas e água, altamente higroscópico, diversificado e organizado. Essas macromoléculas estão envolvidas na membrana basal, adesão e migração celular, comunicação intercelular e regulação de diversas funções celulares (TOBIN, 2005). O colágeno representa 90% das proteínas presentes na derme e 75% do peso seco da pele, sendo que o colágeno do tipo I é o mais abundante (85-90%), seguido do tipo III (8-11%) e por último o colágeno do tipo V (2-4%). É a proteína responsável pela integridade cutânea, morfogênese do tecido e agregação plaquetária. A elastina é o componente fibroso da matriz extracelular, que promove a elasticidade cutânea. O *cross-link* entre as moléculas de elastina confere elasticidade e insolubilidade dessas fibras (TOBIN, 2005; BRUCKER-TUDERMAN, 2003; GOLDSMITH, 1991; UITTO, 1989).

1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO CUTÂNEO

Como a pele é a interface entre o ambiente externo e o organismo, ela possui um sistema inicial de defesa contra microorganismos patógenos e lesões químicas e físicas. Durante a evolução, o tecido cutâneo desenvolveu um ambiente imunológico específico definido primeiramente de tecido linfóide associado à pele (SALT) e em seguida de “sistema imune cutâneo”. O queratinócito é considerado uma célula efetora pró-inflamatória que reage rapidamente aos danos e distúrbios cutâneos, através da produção de citocinas, quimiocinas e padrões moleculares (AMP) associados à patógenos, toxinas, substâncias irritantes, alérgenos e endógenos perigosos (NETLE *et al.*, 2009).

A inflamação é uma resposta frente a infecções, antígenos ou lesão no tecido, com o objetivo de erradicar os microorganismos ou substâncias irritantes e reparar o tecido. Porém, se a inflamação for excessiva pode causar um desequilíbrio fisiológico e promover uma disfunção do organismo, por isso pode ser classificada em aguda e crônica, de acordo com o tempo e características patológicas (SHERWOOD *et al.*, 2004; LIEW, 2003).

Imediatamente após um dano, os queratinócitos iniciam a inflamação cutânea através da imunidade inata, conduzida pelas citocinas e mediada inicialmente pela IL-1. Simultaneamente desenvolve o mecanismo inflamatório oriundo da imunidade adaptativa, o qual promove interações entre os linfócitos B e T, células de Langerhans, células dendríticas da derme, macrófagos e demais células imunes residentes do epitélio (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; ABBAS *et al.*, 2000). Os queratinócitos são capazes de distinguir os patógenos de microorganismos comensais através dos receptores do tipo toll-like (TLR), que identificam os componentes microbianos evolutivamente conservados denominados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), incluindo os lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos, flagelina e ácidos nucleicos, desencadeando ativação da célula hospedeira com mecanismo de sinalização e conseqüente resposta imunológica inata e adaptativa. A expressão de receptores TLR nos queratinócitos promove o estímulo de células Th1 e produção de IFN- γ (NETTLE *et al.*, 2009; MILLER; MODLIN, 2007; JANEWAY, 1989).

Outra forma de identificar PAMP e padrões moleculares associados aos endógenos perigosos (DAMP), que incluem os irritantes, alérgenos e toxinas, é a interação intracelular com o domínio de ligação de nucleotídeos contendo repetições ricas em leucina (NLR), cuja interação ativa o inflamossomo, multiproteína complexa formada pelo NLR, a proteína adaptadora (ASC) e a pró-caspase 1, levando à ativação de caspase-1 com quebra da pró-IL-

1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas pró inflamatórias, IL-1 β e IL-18 respectivamente. Consequentemente, as células imunes residentes na pele (FIGURA 4) são induzidas a amplificar a resposta inflamatória (NESTLE *et al.*, 2009; MARTINON *et al.*, 2009).

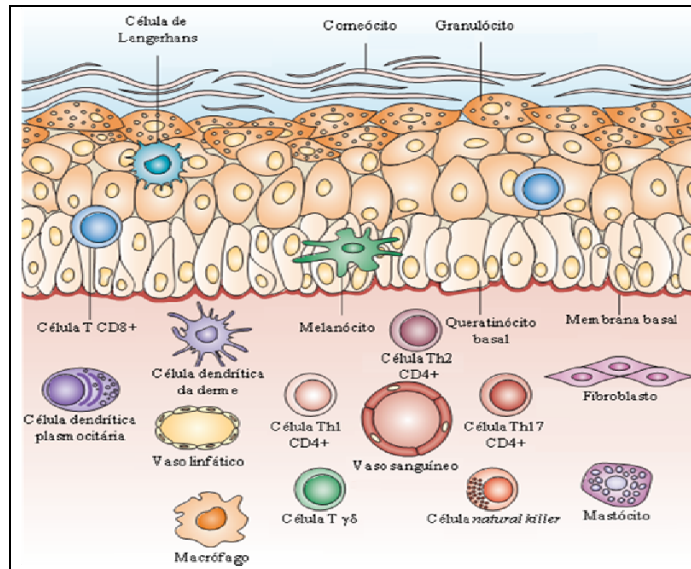


FIGURA 4 - SISTEMA IMUNE CUTÂNEO
FONTE: Adaptação Nestle *et al.* (2009)

Os queratinócitos secretam IL-17 para atuar como fator de sobrevivência e estimular o crescimento da população de linfócitos T residentes na pele, secretam o fator estimulante da colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que estimula e sustenta as células de Langerhans. A interleucina IL-1 α é produzida e armazenada no citoplasma dos queratinócitos para ser liberada imediatamente após uma perturbação celular e iniciar a cascata inflamatória. Essa interleucina sinaliza os queratinócitos vizinhos, os quais respondem produzindo mais IL-1 α , assim como IL-1 β , TNF- α e IL-6 para amplificar a resposta imune (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; KUPPER, 1990; HEUFLER *et al.*, 1993).

A expressão de receptores de quimiocina e síntese dessas moléculas pelos queratinócitos promovem a atração de diferentes tipos celulares à epiderme. Mediante a expressão dos receptores de quimiocina CCL20, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, os queratinócitos ativados atraem células T em distúrbios cutâneos, os quais são caracterizados pela infiltração de linfócitos como ocorre na psoríase e no linfoma de células T. A expressão de CCL20 também regula o tráfego de precursores de células de langerhans para o epitélio. Os neutrófilos são atraídos pelas células epidérmicas através da produção de CXCL1 e CXCL8 durante a inflamação cutânea (NESTLE *et al.*, 2009; ALBANESI *et al.*, 2005; DIEU-NOSJEAN *et al.*, 2000).

As células epidérmicas sintetizam o hormônio timopoietina que auxilia na maturação dos linfócitos T da pele e respondem a estímulos leucocitários. Em resposta ao IFN- γ liberado pelas células T, os queratinócitos expressam a ICAM-1 e iniciam a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; DAHL, 1996).

As células endoteliais também expressam moléculas MHC classe II na presença do IFN- γ , após isso se tornam ativadas e capazes de fagocitar os antígenos que migram para a derme apresentam os antígenos aos linfócitos T intravasculares. Outros sinais co-estimuladores dos linfócitos T são as moléculas de adesão, entre elas a ICAM-1, LFA-1 e cluster de diferenciação 2 (CD2) (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

As células dendríticas residentes do epitélio são consideradas sentinelas da pele, as células de Langerhans são as primeiras a entrar em contato com o antígeno, através da captura e processamento dos lipídios dos antígenos para apresentar às células T efectoras (NETSLE *et al.*, 2009; KLECHEVSKY *et al.*, 2008; STOITZNER *et al.*, 2006). Paralelamente, as células dendríticas da derme migram para o linfonodo e estimulam a proliferação de linfócitos, além de sintetizarem citocinas e quimiocinas, que erradicam o patógeno ou contribuem para uma inflamação persistente (NETSLE *et al.*, 2009; FUKUNAGA *et al.*, 2008).

As citocinas TNF, IL-1 e IL-6 são estimuladoras da síntese de lipídios e potentes mitógenos, por isso, o aumento agudo dessas moléculas parece ser crucial para o processo de reparo da barreira cutânea. Porém, se o rompimento da barreira for prolongado, o aumento crônico na produção das citocinas pode causar efeitos danosos promovendo inflamação e proliferação epidérmica. O rompimento na barreira de permeabilidade, hiperproliferação epidérmica e inflamação são encontradas em diversas patologias cutâneas como as dermatites de contato irritativas e alérgicas, dermatite atópica e psoríase (PROKSCH *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2004; JENSES *et al.*, 1999; WOOD *et al.*, 1992).

A dermatite de contato é um distúrbio inflamatório cutâneo desencadeado pela exposição da pele às moléculas de baixo peso molecular com propriedades pró-inflamatórias e antigênicas (BONNEVILLE *et al.*, 2007; ROWLAND *et al.*, 2001; SAINT-MEZARD *et al.*, 2004). Essas moléculas causam a ativação das células epidérmicas, resultando em rápida produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e quimiocinas como CCL20 que promovem o recrutamento e ativação dos precursores das células dendríticas e migração destas aos linfonodos (BONNEVILLE *et al.*, 2007; PASTORE *et al.*, 2004; SAINT-MEZARD *et al.*, 2004).

Os irritantes podem gerar um antígeno não específico inflamatório e desenvolver a dermatite de contato irritativa (DCI) ou no caso do hapteno, gerar imunoglobulinas específicas através da ligação covalente com resíduos de aminoácidos gerando proteínas modificadas imunogênicas para induzir a dermatite de contato alérgica (DCA) (BONNEVILLE *et al.*, 2007; BASKETTER *et al.*, 1999; LEPOITTEVIN; LEBLOND, 1997; SMITH PEASE *et al.*, 2003). As evidências clínicas das duas dermatites é bastante similar e incluem eritema, edema, vesículas, pápulas, bolhas, fissuras e necrose cutânea.

DCI apresenta alguns sintomas diferenciados como foliculite, acne, alterações pigmentares, alopecia e reações granulomatosas (SLODOWNNIK *et al.*, 2008).

A DCI é uma combinação de fatores endógenos e exógenos, os quais desencadeiam uma cascata patofisiológica com distúrbio da barreira cutânea, dano celular na membrana do queratinócito e liberação de mediadores pró-inflamatórios resultando em sintomas clínicos (SLODOWNNIK *et al.*, 2008; MARKS *et al.*, 2002). Os queratinócitos têm papel fundamental na resposta imunológica aos irritantes, com liberação de IL-1 α , IL-1 β e TNF- α durante o distúrbio da barreira, aumento na expressão do MHC II e moléculas de adesão celular, enquanto a quimiocina CCL21 é produzida pelas células endoteliais linfáticas da derme para facilitar a migração leucocitária (SLODOWNNIK *et al.*, 2008; HUNZIKER *et al.*, 1992; ENK; KATZ, 1992; EBERHARD *et al.*, 2004). A concentração, volume, tempo de aplicação e duração da exposição do irritante determina a agressividade dessa dermatite, sendo que a exposição simultânea ou subsequente de dois irritantes pode aumentar ou até neutralizar o efeito da DCI (SLODOWNNIK *et al.*, 2008; MCFADDEN *et al.*, 2000).

A DCA é também denominada hipersensibilidade de reação tardia, composta de duas fases: sensibilização e desafio. A fase de sensibilização tem duração de 10-15 dias nos humanos e 5-7 dias em camundongos e na maioria das vezes não demonstra nenhum sinal clínico, caracterizada pelo reconhecimento do hapteno através das células de Langerhans quando entra em contato com a pele pela primeira vez. As células de Langerhans migram para a região paracortical dos linfonodos e iniciam as células T mediante a apresentação dos complexos protéicos do hapteno pelo MHC (VOCANSON *et al.*, 2009, BONNEVILLE *et al.*, 2007; BOUR *et al.*, 1995; KRASTEVA *et al.*, 1998). Na fase desafio, o mesmo hapteno penetra na pele desencadeando o recrutamento das células T ativadas e específicas para a epiderme e derme, e o processo inflamatório inicia via indução da apoptose nos queratinócitos. Os sintomas clínicos do desafio surgem em 72 horas no humano e 24-48 horas no camundongo, com persistência da reação inflamatória em alguns dias e rapidamente decai através de mecanismos de *downregulation* (VOCANSON *et al.*, 2009). A severidade

dessa resposta inflamatória varia de prurido a eritema em uma DCA transitória até uma dermatite severa com longa exsudação na DCA moderada (BONNEVILLE *et al.*, 2007; BOUR *et al.*, 1995; KEHREN *et al.*, 1999).

Enquanto as dermatites iniciam na exposição de um irritante ou alérgeno, a psoríase é um distúrbio multifatorial, resultante de fatores genéticos e ambientais, como medicação, infecção ou trauma (RÁCZ; PRENS, 2009). A maior incidência de psoríase ocorre na população branca, em locais geográficos com maior incidência solar, em pessoas com idade média de 33 anos, em ambos os sexos (GRIFFITHS; BARKER, 2007). Os processos moleculares e celulares envolvidos na psoríase tem similaridade com a doença de Crohn, artrite reumatóide e esclerose múltipla (RÁCZ; PRENS, 2009).

A avaliação mais comumente utilizada é o diagnóstico clínico através da análise das placas pápulo-escamosas, as quais são bem delineadas, de coloração vermelha ou salmão, cobertas de branco e cinza. As placas possuem maior atividade nas bordas, com pele normal no centro das lesões, são distribuídas simetricamente e geralmente ocorrem na extensão dos cotovelos, joelhos, couro cabeludo, região lombo sacral e umbigo. A atividade inflamatória da psoríase é caracterizada pelo fenômeno de Koebner, em que as lesões se desenvolvem em locais de trauma e pressão. As principais características histológicas são hiperplasia epidérmica, vasos proeminentes na derme e infiltrado inflamatório de leucócitos (GRIFFITHS; BARKER, 2007).

A hiperplasia epidérmica é oriunda do distúrbio no balanço da proliferação e diferenciação e da ausência da camada granular. Os marcadores de diferenciação inicial, involucrina e proteínas pequenas ricas em prolina, são aumentados, enquanto os marcadores de diferenciação tardia, filagrina, loricrina e caspase-14, são reduzidos, esse desequilíbrio nos marcadores altera a barreira cutânea tornando a doença ainda mais severa (RÁCZ; PRENS, 2009).

As respostas imunológicas inapta e adaptativa são cruciais para o início e manutenção das placas psoríticas, com infiltrado de leucócitos, principalmente do tipo CD4+ e CD8+, os quais precedem a hiperplasia. A molécula-1 de adesão intercelular tem expressão aumentada nos queratinócitos epidérmicos e a selectina-E nos capilares dérmicos. As citocinas da cascata Th1 são predominantes na placa (IFN- γ , IL-2, IL-12), tanto que a psoríase é classificada como distúrbio Th1, por isso que a ciclosporina, imunossupressor de Th1, é eficaz em psoríase (GRIFFITHS; BARKER, 2007).

Quando a hiperplasia se instala na pele, a barreira cutânea torna-se danificada, as células NK participam do processo inflamatório da placa e os neutrófilos penetram nas placas pustulares (GRIFFITHS e BARKER, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

A inibição da enzima hidroximetil-glutaril-coenzima (HMG-CoA) pelas estatinas promove efeitos pleiotrópicos devido ao bloqueio promovido na biossíntese de colesterol e demais moléculas originadas durante esta síntese. Na década de 90 foi observado que pacientes que fizeram transplante cardíaco e tratamento concomitante com pravastatina não apresentaram rejeição do tecido (EGESI *et al.*, 2010; KOBASHIGAWA *et al.*, 1995). Em seguida, foi verificado que a sinvastatina é capaz de reverter o quadro de artrite reumatóide induzida em camundongos e também em humanos quando administrada pela via oral (KANDA *et al.*, 2007; LEUNG *et al.*, 2003). Além disso, há evidências que as estatinas possuem atividade imunomodulatória através da redução na produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios e inibição na migração leucocitária (EGESI *et al.*, 2010; NEZIC, 2009; DEVARAJ *et al.*, 2006; TURNER *et al.*, 2005; NAMAZI, 2004; KWAK *et al.*, 2000). GHAZIZADEH *et al.*, 2011; GLYNN *et al.*, 2008) avaliaram pacientes com psoríase e hiperlipidemia em tratamento oral com sinvastatina, e observaram que houve redução na área e na severidade das placas psoriáticas.

Apesar das investigações sobre a atividade anti-inflamatória das estatinas, estas eram administradas pela via oral. Em 2006, Otuki e colaboradores demonstraram que a sinvastatina também possui ação anti-inflamatória tópica, e sugeriram a necessidade de se avaliar a eficácia e segurança da sinvastatina em uma formulação dermatológica e em tratamento crônico.

Portanto, este trabalho visou avaliar a atividade anti-inflamatória tópica da sinvastatina em uma formulação dermatológica, nos modelos agudo e crônico em camundongos, com o objetivo de investigar seus possíveis mecanismos de ação e buscar um tratamento alternativo ao uso de glicocorticóides em patologias dermatológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica da sinvastatina e seu mecanismo de ação em modelos de inflamação cutânea aguda e crônica em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento dos veículos pomada e emulsão óleo em água (o/a) para aplicação tópica da sinvastatina;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica de diferentes veículos contendo sinvastatina em modelo agudo de inflamação cutânea em camundongos;
- Selecionar o veículo mais adequado para dar continuidade ao estudo;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do veículo selecionado contendo sinvastatina em modelo crônico de inflamação cutânea em camundongos;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação da sinvastatina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E MANUTENÇÃO

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFPR. Os animais foram mantidos em condições e temperatura controlada ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram mantidos na sala de experimento durante pelo menos uma hora antes da realização dos estudos para adaptação. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (CEEA, 2003) e os protocolos experimentais foram submetidos à apreciação ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Paraná, sob o numero 483.

4.2 DROGAS E REAGENTES

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas, reagentes e matérias-primas: TPA, solução salina de tampão fosfato (PBS), hexadeciltrimetilamônio (HTAB), tetrametilbenzidina (TMB), hematoxilina, eosina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), dexametasona, sinvastatina (Galena, Campinas, Brasil), formato de amônio (Acros Organics, Geel, Bélgica), etanol absoluto, formaldeído, ácido acético, ácido fórmico, xilol, polisorbato 20 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), citrato de sódio, acetato de sódio, floxina B, acetona, N,N-dimetilformamida (DMF), (Merck Biosciences, Bad Soden, Alemanha), EDTA dissódico, Propilenoglicol, Goma xantana, Crosspolímero de acrilato / alquil acrilato C10-C30, Metilparabeno, Ácido esteárico, Álcool cetílico, Ácool cetoestearílico, Óleo de semente de uva, Mineral Oil, Estearato de glicerila e estearato de PEG-100, Hidroxitolueno butilado (BHT), Propilparabeno, Trietanolamina, Fenoxietanol, Glicerina, água desmineralizada, cera de abelhas, vaselina sólida, óleo mineral (Cosmotec, São Paulo, Brasil).

Para administração tópica, a sinvastatina e a dexametasona foram incorporadas nos veículos pomada e emulsão o/a. O agente flogístico TPA foi solubilizado em acetona.

4.3 DESENVOLVIMENTO DOS VEÍCULOS

Foram preparados dois veículos: emulsão o/a e pomada. Em ambos foi incorporada a sinvastatina a 1 e 3 %, e dexametasona a 0,5%. A composição dos veículos está demonstrada nas TABELAS 1 e 2.

4.3.1 Preparação emulsão o/a

A emulsão o/a foi preparada através da emulsificação das fases oleosa e aquosa (TABELA 1). Ambas as fases foram aquecidas separadamente à temperatura de $75 \pm 5^\circ\text{C}$, em seguida a fase oleosa foi vertida lentamente sobre a aquosa sob agitação constante de 600 rpm, com o auxílio de um agitador mecânico (Fisaton, Mod713D), e contínua até que a emulsão atingisse 35°C . Nesta etapa foi adicionado o fármaco disperso em glicerol, ainda sob contínua agitação. Posteriormente, iniciou-se o processo de resfriamento até a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) (AZZINI, 1999). Aproximadamente 5 g de cada amostra das emulsões foram pesados e submetidos, na centrífuga (Fanem, Mod 206R) ao ciclo 2500 rpm (440 g) durante 15 minutos, e em temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) (adaptado de AZZINI, 1999). O valor de pH foi determinado à temperatura ambiente de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra (Peagômetro Digimed Mod. DM20) (adaptado de AZZINI, 1999).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DAS EMULSÕES O/A

Matéria-prima (INCI)	Formulação (%)							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
EDTA dissódico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Propilenoglicol	10	10	10	10	10	10	10	10
Goma xantana	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Crosspolímero de acrilato / alquil acrilato C10-C30	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Metilparabeno	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ácido esteárico	3	3	3	3	3	3	3	3
Álcool cetílico	1	1	1	1	1	1	1	1
Alcool cetosteárilico	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Óleo de semente de uva	2	2	2	2	-	-	-	-
Mineral Oil	5	5	5	5	5	5	5	5
Estearato de glicerila e estearato de PEG-100	2	2	2	2	2	2	2	2
Hidroxitolueno butilado (BHT)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Propilparabeno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Trietanolamina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fenoxietanol	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Uréia	6	6	6	6	6	6	6	6
Sinvastatina ou Dexametasona	-	0,5	1	3	-	0,5	1	3
Glicerina	8	8	8	8	8	8	8	8
Água demineralizada	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp
	100	100	100	100	100	100	100	100

FONTE: Própria do autor (2011)

4.3.2 Preparação pomada

A pomada foi preparada através da fusão e homogeneização das matérias-primas (TABELA 2). Os componentes, exceto o fármaco, foram aquecidos a $75 \pm 5^\circ\text{C}$, homogeneizados e mantidos à temperatura ambiente de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ para o resfriamento até atingir a temperatura de 40°C . Em seguida foi feita a incorporação dos fármacos.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DAS POMADAS

Matéria-prima (INCI)	Formulação (%)							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Cera de abelhas	5	5	5	5	-	-	-	-
Propilparabeno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Óleo mineral	10	10	10	10	10	10	10	10
Hidroxitolueno butilado (BHT)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sinvastatina ou Dexametasona	-	0,5	1	3	-	0,5	1	3
	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp
Vaselina sólida	100	100	100	100	100	100	100	100

FONTE: Própria do autor (2011)

4.4 MODELO DE EDEMA DE ORELHA

O modelo de edema de orelha é bastante útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica de drogas e fármacos, uma vez que é um método bastante simples e que permite verificar a atividade das drogas no edema induzido por agentes irritantes. Além disso, requer pequenas quantidades de droga e proporciona resultados reprodutíveis com baixa possibilidade de erro (GÁBOR, 2003).

4.4.1 Avaliação do Edema

O edema é expresso como o aumento da espessura (μm) da orelha dos camundongos. A mensuração da espessura da foi feita na região próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi determinada com o auxílio de um micrômetro digital (Great, MT-04513). O edema foi avaliado pela diferença entre a medida basal, espessura da orelha mensurada no primeiro dia de experimento, e a medida após determinado tempo da indução do processo

inflamatório. Para minimizar as variações da técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

4.4.2 Aplicação tópica de TPA

O TPA, um éster de forbol, é utilizado em modelo animal para analisar a atividade anti-inflamatória. No modelo agudo, 2,5 µg de TPA foram dissolvidos em 20 µL de acetona (2,5 µg/20 µL), enquanto no modelo crônico, a concentração de TPA dissolvida em acetona foi na proporção de 2,0 µg/20 µL. Este volume de 20 µL contendo TPA foi aplicado na orelha direita dos camundongos.

4.4.3 Avaliação do Edema Induzido pela Aplicação Tópica de TPA

O edema agudo foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha), e em seguida os camundongos foram tratados com sinvastatina ou dexametasona ou veículo, dissolvidos em acetona ou incorporados em pomada. Para o tratamento em acetona, foi aplicado um volume de 20 µL na orelha contendo sinvastatina nas doses de 0,24; 0,71 e 2,4 µM, e dexametasona na dose de 0,13 µM. As pomadas de sinvastatina nas doses de 1% e 3%, e de dexametasona na dose de 0,5% (controle positivo) foram administradas topicamente (cerca de 20mg/orelha) na face anterior e posterior da orelha, com movimentos circulares durante 5 segundos.

A espessura da orelha foi medida antes (basal) e 6 horas após a aplicação do TPA. Vinte e quatro horas após a aplicação de TPA, foram coletadas amostras do tecido das orelhas dos camundongos com o auxílio de um punch (6 mm), as quais foram armazenadas a -80°C para posterior análise da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO). Para a análise histológica, as amostras foram imediatamente colocadas em solução alfac.

4.4.4 Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Múltipla de TPA

Esse modelo de inflamação crônica permite avaliar a ação anti-inflamatória do fármaco frente a um processo inflamatório já estabelecido. O processo inflamatório crônico foi induzido pela múltipla aplicação de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados, durante 9 dias. As pomadas de sinvastatina e dexametasona (controle positivo) foram administradas a partir do quinto dia de experimento pela via tópica (cerca de 20 mg/orelha), durante 4 dias consecutivos (2 vezes ao dia), e o edema foi avaliado diariamente (STANLEY *et al.*, 1991). No 9º dia de experimento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foram coletadas amostras de 6 mm das orelhas, as quais foram pesadas e armazenadas a -80°C para posterior análise da atividade enzimática MPO. Para a análise histológica, as amostras foram imediatamente colocadas em solução alfac.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Para a avaliação da atividade enzimática de MPO, foi utilizada a metodologia de Bradley *et al.* (1982) modificada por De Young *et al.* (1989). As amostras de orelha (círculos de 6 mm) foram adicionadas a 750 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB e homogeneizadas por aproximadamente 45 segundos a 0°C. Os homogenatos foram precipitados em microtubos e adicionados a 750 µL do tampão anteriormente descrito. As amostras (1500 µL) foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 11200 g a 4°C por 20 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, com posterior adição de 200 µL de uma solução contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, 85 µL de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,22M pH 5,4 e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µL de TMB 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8 %, promoveu o início da reação. A placa foi incubada a 37 °C por 3 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) com comprimento de onda de 620 nm e o resultado foi expresso em mDO/orelha.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras das orelhas foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 horas. Em seguida foram conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As amostras foram posteriormente desidratadas, adicionadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 μ m em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram analisadas em áreas representativas com aumento de 200x e 400x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme foi realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 400x, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A análise dos dados foi feita por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparação múltipla Newman-Keuls, considerando o intervalo de confiança de 95%. A análise será realizada mediante o software estatístico GraphPad Prism version 3.0 (San Diego Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA SINVASTATINA EM ACETONA NO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA

Conforme demonstrado na FIGURA 5, a aplicação tópica de TPA promoveu aumento na espessura da orelha quando avaliada 6 h após a indução. O edema de orelha causado pelo TPA foi inibido de forma dependente dose pela aplicação tópica da sinvastatina (0,24 – 2,40 μM), com DI_{50} de 0,47 (0,22 – 1,13) μM e com inibição máxima de $70 \pm 4\%$ em 2,40 μM , significativamente similar ao grupo tratado com TPA e dexametasona (Dexa) ($96 \pm 1\%$ em 0,13 μM).

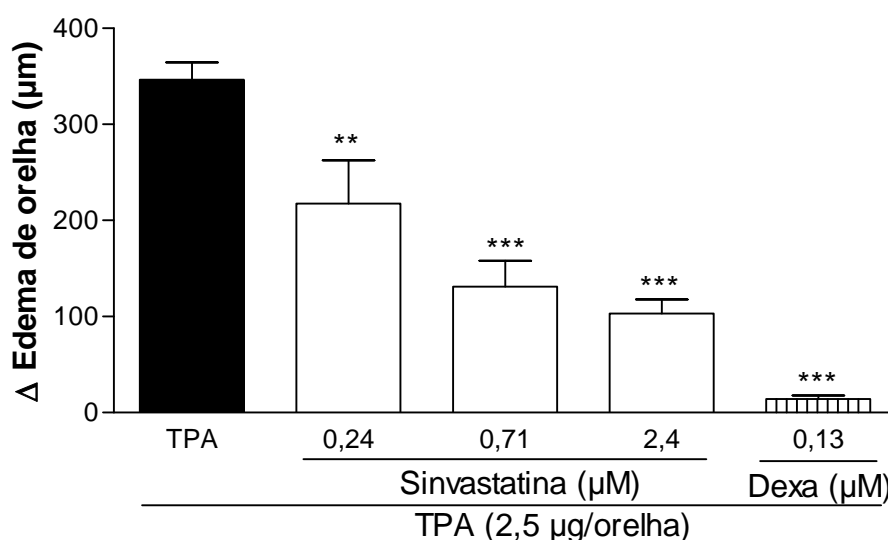


FIGURA 5 – EFEITO DA SINVASTATINA EM ACETONA NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR APLICAÇÃO ÚNICA DE TPA

FONTE: Própria do autor (2011)

A barra preta representa o grupo tratado com o TPA; as barras brancas representam os grupos tratados com TPA e sinvastatina e a barra listrada representa o grupo tratado com TPA e dexametasona (Dexa). Cada barra representa a média \pm EPM ($n = 5$). *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo TPA (one-way ANOVA seguido de teste Newman-Keuls).

5.2 EFEITO DA SINVASTATINA EM ACETONA NA ATIVIDADE DA MPO NO MODELO AGUDO INDUZIDO POR TPA

Como foi observado que a sinvastatina reduziu o edema induzido por TPA no modelo agudo, foi analisada a atividade da mieloperoxidase (MPO) para verificar a infiltração de leucócitos polimorfonucleares. De acordo com a FIGURA 6, o TPA causou um aumento na atividade de MPO quando comparado ao grupo naive (não tratado), e a aplicação de sinvastatina (0,24 – 2,40 μ M) foi capaz de reduzir o aumento da atividade da MPO induzida pelo TPA, em $40 \pm 11\%$, $42 \pm 8\%$ e $39 \pm 10\%$, respectivamente, enquanto a Dexa reduziu a atividade da MPO em $61 \pm 3\%$.

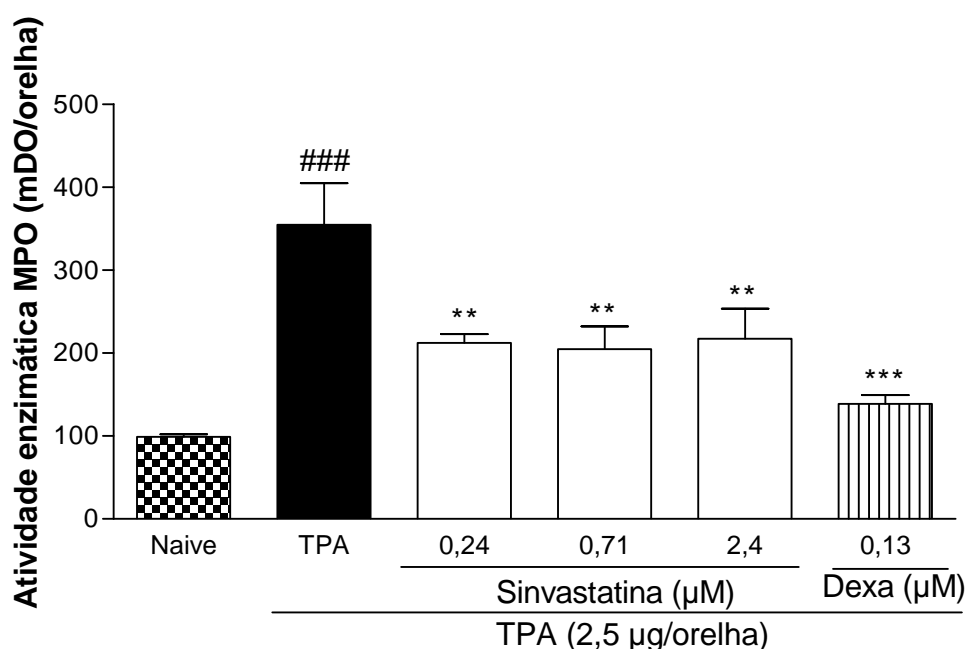


FIGURA 6 – EFEITO DA SINVASTATINA EM ACETONA NA ATIVIDADE DA MPO
FONTE: Própria do autor (2011)

A barra quadriculada representa o grupo naive (não tratado); a barra preta representa o grupo tratado com o TPA; as barras brancas representam os grupos tratados com TPA e sinvastatina e a barra listrada representa o grupo tratado com TPA e Dexa. Cada barra representa a média \pm EPM ($n = 5$). ### $P < 0,001$, quando comparado ao grupo naive; *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo TPA (one-way ANOVA seguido de teste Newman–Keuls).

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM ACETONA NO MODELO AGUDO

Para confirmar a redução do edema e da MPO, foi feita a análise histológica do tecido das orelhas. Foi revelado que 24 h após a indução da inflamação com TPA (b) ocorreu edema e infiltração leucocitária no tecido (FIGURA 7). Estes eventos foram inibidos após a aplicação tópica de sinvastatina a 2,4 μ M (d), assim como ocorreu com o grupo Dexametasona a 0,13 μ M (c), ambos os tratamentos foram veiculados em acetona. A contagem de células na derme aumentou significativamente após 24 h da indução com TPA, quando comparado ao grupo naïve, e foi observado que a sinvastatina (2,4 μ M) reduziu a infiltração de células de forma similar à Dexametasona (0,13 μ M), conforme apresentado na FIGURA 8.

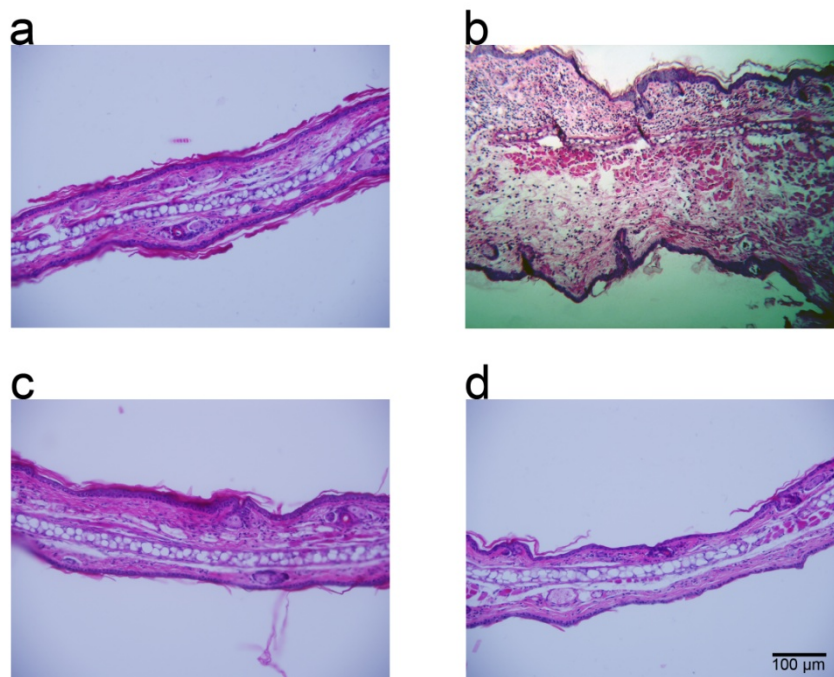


FIGURA 7 - ANÁLISE HISTOLÓGICA APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM ACETONA NO MODELO AGUDO
FONTE: Própria do autor (2011)

Alterações histopatológicas (hematoxilina-eosina, 20x) causada pela sinvastatina na orelha de camundongos tratada com uma única aplicação de TPA. As micrografias estão apresentadas na escala de 100 μ m e representam os grupos: (a) naïve (não tratado); (b) TPA

(2,5 $\mu\text{g}/\text{orelha}$); (c) TPA e Dexta (0,13 μM); (d) TPA e sinvastatina (2,4 μM). As micrografias são representativas de $n=3-4$.

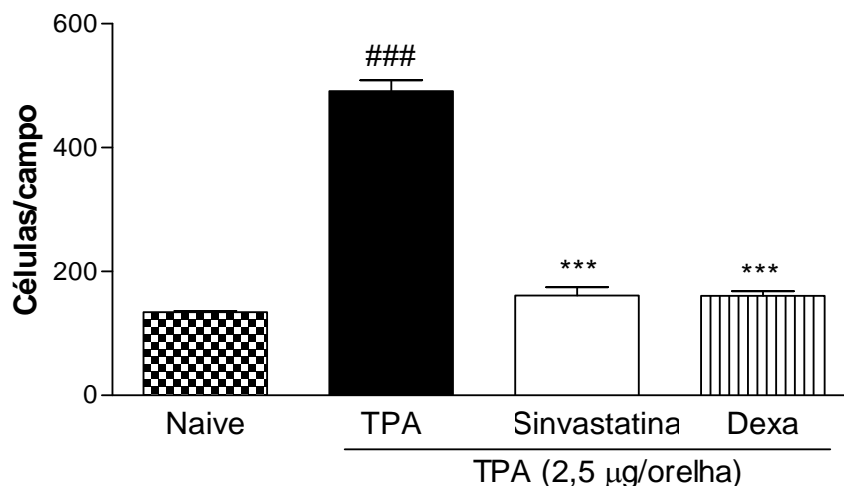


FIGURA 8 – CONTAGEM DE LEUCÓCITOS APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM ACETONA NO MODELO AGUDO

FONTE: Própria do autor (2011)

Contagem da migração leucocitária a partir das micrografias histopatológicas (hematoxilina-eosina, 20x), obtidas das amostras de orelha. A barra quadriculada representa o grupo naive (não tratado); a barra preta representa o grupo tratado com TPA; a barra branca representa o grupo tratado com TPA e sinvastatina (2,4 μM) e a barra listrada representa o grupo tratado com TPA e Dexta (0,13 μM). Cada barra representa a média \pm E.P.M ($n = 3$). ### $P < 0,001$, quando comparado ao grupo naive; *** $P < 0.001$, quando comparado ao grupo TPA (one-way ANOVA seguido de teste Newman-Keuls).

5.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS VEÍCULOS DESENVOLVIDOS

Após a manipulação, as emulsões o/a foram centrifugadas e o pH foi aferido para verificar a sua estabilidade e compatibilidade com a pele, respectivamente. Conforme demonstrado na TABELA 3, as formulações apresentaram pH entre 6,0 e 6,48 e não demonstraram instabilidade após o teste de centrifugação.

Devido às características físico-químicas da forma galênica pomada, não foram realizadas análises de centrifugação e pH.

TABELA 3 – RESULTADOS DO TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO E PH DAS EMULSÕES

Formulação	Centrifugação	pH
F1	N	N
F2	N	N
F3	N	N
F4	N	N
F5	N	N
F6	N	N
F7	N	N
F8	N	N

Onde, N = Normal (estável).

FONTE: Própria do autor (2011)

5.5 SELEÇÃO DO VEÍCULO MEDIANTE ANÁLISE DO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA

Com o objetivo de verificar a possível influência da pomada e emulsão o/a na atividade anti-inflamatória da sinvastatina, foi realizado um experimento de edema de orelha após a aplicação dos veículos (FIGURA 9). A primeira fórmula de pomada foi feita com cera de abelhas para aumentar a viscosidade, e a emulsão foi manipulada com óleo de semente de uva para fornecer maior emoliência, porém, como a cera de abelhas e o óleo de semente de uva são reconhecidos pela sua atividade anti-inflamatória, foi levantada a hipótese de que estes adjuvantes poderiam reverter a formação do edema. Em virtude disso, foi realizado um experimento para comparar os veículos com (F1) e sem cera e óleo (F5) na sua composição.

Na FIGURA 9, observa-se que o grupo TPA ocasionou edema de orelha após seis horas da aplicação de TPA, enquanto os veículos analisados não foram capazes de impedir significativamente a formação do edema. A partir desse resultado, verificou-se que ambos os veículos, pomada e emulsão o/a, podem ser utilizados. Apesar dos veículos F1 (com cera e óleo) não apresentarem diferença significativa dos veículos F5 (sem cera e óleo), foi decidido utilizar os veículos F5 para garantir que os experimentos crônicos também não tivessem influência de adjuvantes de fórmula.

Entre os veículos F5, a pomada foi selecionada para ser incluída nas avaliações, considerando a sua característica oclusiva e consequentemente benéfica no tratamento de patologias cutâneas (WOOD *et al.*, 1992; GRUBAUER *et al.*, 1989).

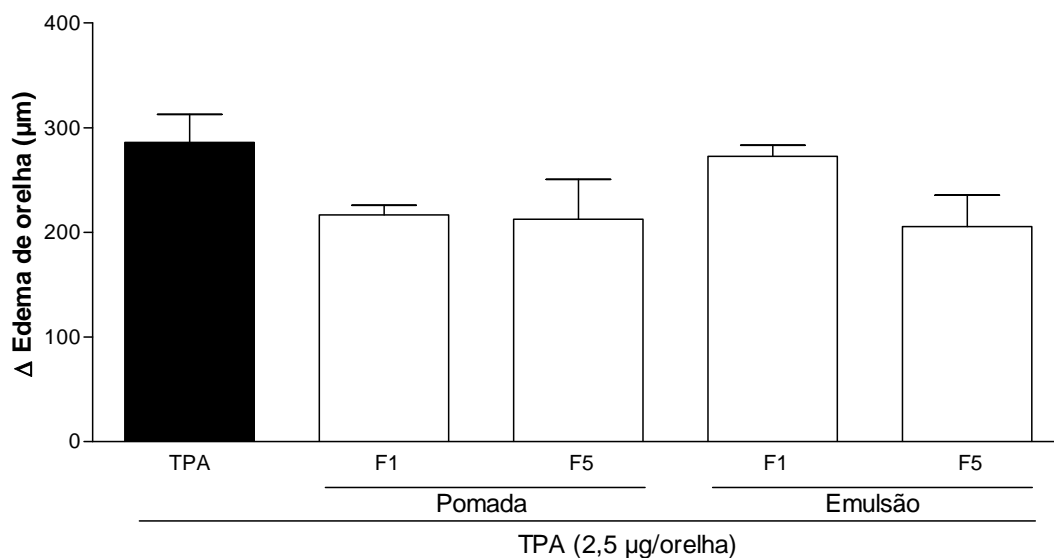


FIGURA 9 – SELEÇÃO DO VEÍCULO MEDIANTE ANÁLISE DO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA
 FONTE: Própria do autor (2011)

Efeito dos veículos no edema de orelha. A barra preta representa o grupo tratado com TPA; as barras brancas representam os grupos tratados com TPA e veículos: pomada com cera de abelhas (F1), pomada sem cera de abelhas (F5), emulsão o/a com cera de abelhas (F1), emulsão o/a sem cera de abelhas (F5). Cada barra representa a média \pm EPM ($n = 5$). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$) (one-way ANOVA seguido de teste Newman-Keuls).

5.6 EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA

Para investigar a eficácia da sinvastatina incorporada em pomada, os animais receberam tratamento tópico na orelha com sinvastatina a 1% e 3%, e dexametasona a 0,5%. Conforme demonstrado na FIGURA 10, o veículo causou redução do edema em 24% quando comparado com o grupo TPA. No entanto, a inibição do edema promovido pela sinvastatina a

1% e 3% foi significativa, causando redução de $40 \pm 10\%$ e $54 \pm 11\%$, respectivamente, enquanto a Dexa a 0,5% promoveu reversão do edema em $95 \pm 3\%$, quando comparado ao grupo TPA e veículo.

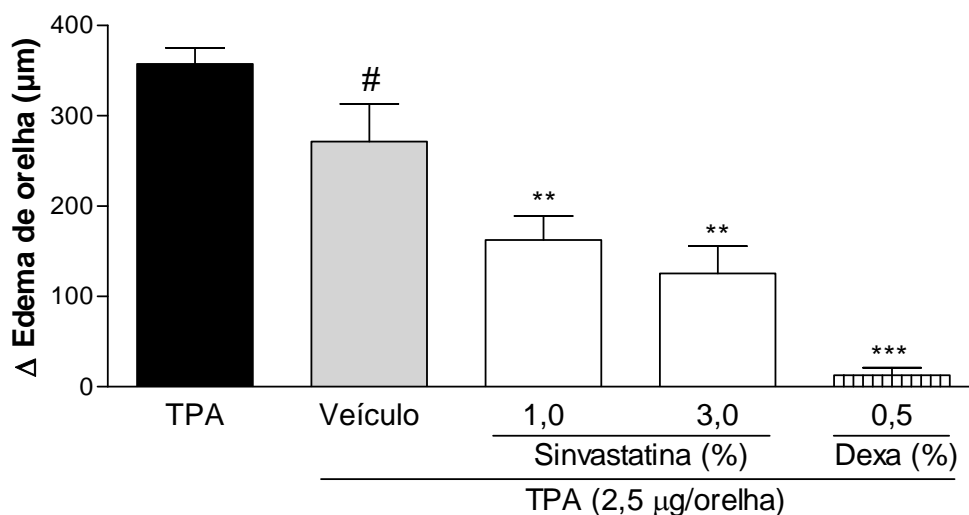


FIGURA 10 – EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NO EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO POR TPA

FONTE: Própria do autor (2011)

Efeito da simvastatina em pomada no modelo agudo de edema de orelha. A barra preta representa o grupo tratado com TPA; a barra cinza representa o grupo tratado com TPA e veículo; as barras brancas representam os grupos tratados com TPA e simvastatina e a barra listrada representa o grupo tratado com TPA e Dexa. Cada barra representa a média \pm EPM ($n = 5$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, quando comparado ao grupo TPA e veículo; # $P < 0,05$, quando comparado ao grupo TPA (one-way ANOVA seguido de teste Newman-Keuls).

5.7 EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NA ATIVIDADE DA MPO NO MODELO AGUDO INDUZIDO POR TPA

Como foi observado que a simvastatina em pomada reduziu o edema induzido por TPA no modelo agudo, foi analisada a atividade da mieloperoxidase (MPO) para verificar a infiltração de leucócitos polimorfonucleares. De acordo com a FIGURA 11, a aplicação de TPA causou aumento na atividade da MPO quando comparado ao grupo naive (sem

tratamento) e o veículo causou redução do edema em 18% quando comparado com o grupo TPA. No entanto, o grupo tratado com sinvastatina 1% e 3% inibiram a atividade enzimática de MPO em $52 \pm 12\%$ e $64 \pm 8\%$, respectivamente, enquanto a Dexa reduziu a MPO em $82 \pm 3\%$, quando comparado ao grupo TPA e veículo.

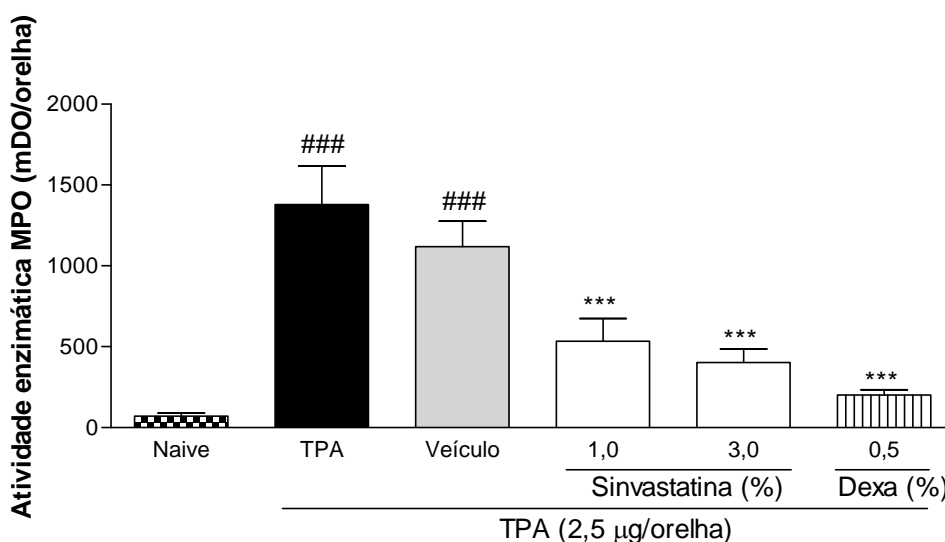


FIGURA 11 – EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NA ATIVIDADE DA MPO NO MODELO AGUDO INDUZIDO POR TPA

FONTE: Própria do autor (2011)

Efeito da sinvastatina em pomada na atividade de MPO. A barra quadriculada representa o grupo naíve (não tratado), a barra preta representa o grupo tratado com TPA; a barra cinza representa o grupo tratado com TPA e veículo; as barras brancas representam os grupos tratados com TPA e sinvastatina e a barra listrada representa o grupo tratado com TPA e Dexa. Cada barra representa a média \pm EPM ($n = 5$). *** $P < 0,001$, quando comparado ao grupo TPA e veículo; #### $P < 0,001$, quando comparado ao grupo naíve (one-way ANOVA seguido de teste Newman–Keuls).

5.8 EFEITO DA SINVASTATINA NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA CRÔNICO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA

Conforme demonstrado nas FIGURAS 10 e 11, a sinvastatina quando incorporada em pomada foi capaz de reverter a formação de edema e migração leucocitária causada pela

indução de TPA no tecido da orelha, em modelo agudo. Em virtude desses resultados, foi verificado se no modelo crônico, com aplicação múltipla de TPA, a sinvastatina causava o mesmo efeito anti-inflamatório do modelo agudo.

Os grupos tratados foram tratados com as pomadas 2 vezes ao dia, em dias alternados, sendo o início do 5º dia e final no 9º dia. Os grupos que não receberam indução de TPA, e que foram tratados com sinvastatina 1%, 3% e veículo, não apresentaram alterações no edema, peso (FIGURAS 12 e 13) e espessura da epiderme (FIGURA 16). As aplicações múltiplas de TPA causaram aumento expressivo do edema, assim como ocorreu no grupo tratado com veículo + TPA, confirmando mais uma vez que o veículo não é capaz de reverter o edema provocado pelo TPA.

O grupo tratado com sinvastatina 1% + TPA, foi capaz de reduzir o edema de orelha em $25 \pm 11\%$ no segundo dia de tratamento até o último dia de experimento com $23 \pm 3\%$ (FIGURA 8). O grupo tratado com Dexametasona + TPA revelou inibição do edema em $51 \pm 10\%$ no segundo dia, até $71 \pm 3\%$ no último dia de tratamento. Porém, repetidas aplicações de sinvastatina 3% + TPA demonstrou aumento significativo de 35% no edema de orelha, após 3 dias experimento, em relação ao veículo + TPA (FIGURA 12).

A FIGURA 13 apresenta o resultado do peso das orelhas, o qual foi similar à resposta observada no edema de orelha (FIGURA 12). A aplicação continuada de veículo, sinvastatina 1 e 3% não alteraram o peso das orelhas quando comparado ao naïve (sem tratamento). Enquanto os grupos TPA e veículo + TPA causaram aumento no peso das orelhas quando comparado com grupo naïve ou veículo, mas este efeito não foi significativamente diferente entre si. O tratamento com sinvastatina 1% mais TPA reduziu o peso da orelha significativamente em $15 \pm 1\%$, enquanto o grupo Dexametasona e TPA reduziu em $53 \pm 10,3\%$ quando comparado ao grupo veículo e TPA. Já o grupo tratado com sinvastatina 3% e TPA aumentou o peso das orelhas em $22 \pm 7\%$.

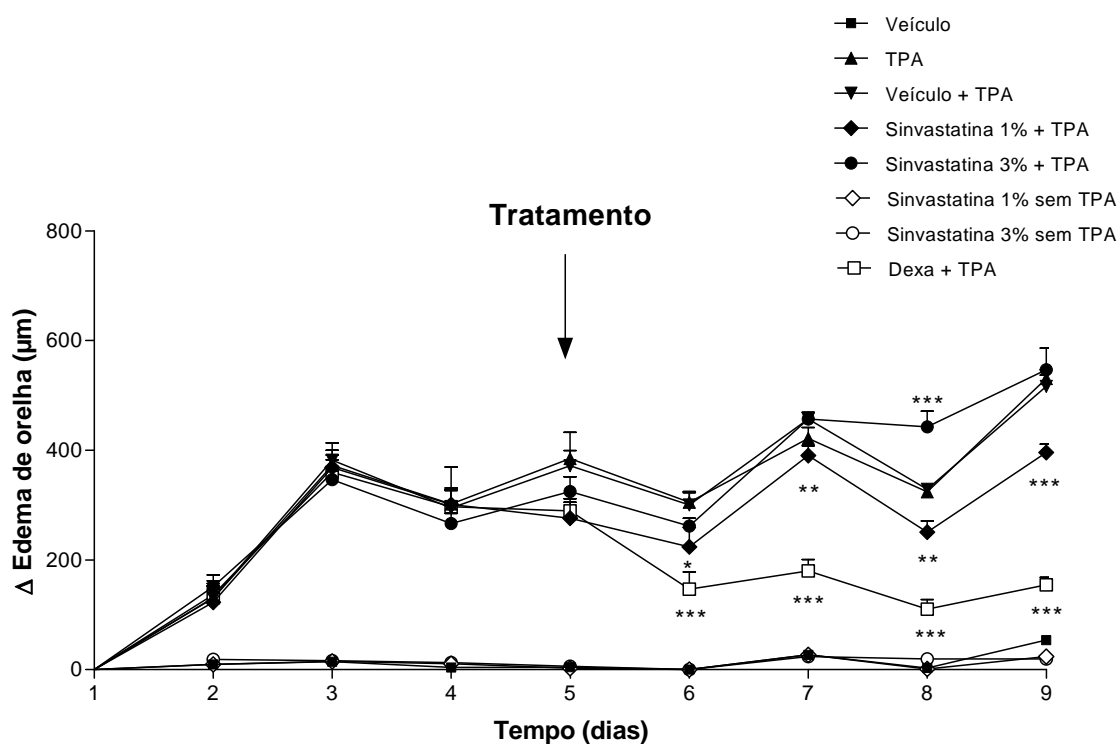


FIGURA 12 – EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NO EDEMA DE ORELHA CRÔNICO INDUZIDO POR TPA

FONTE: Própria do autor (2011)

Efeito da sinvastatina em pomada no modelo de inflamação crônica na orelha. O edema foi induzido com TPA (2,0 μg/orelha), durante 9 dias alternados. Os grupos foram tratados com as pomadas 2 vezes ao dia, a partir do quinto dia. Os resultados foram obtidos dos grupos: veículo, TPA, veículo e TPA, sinvastatina 1% e TPA, sinvastatina 3% e TPA, sinvastatina 1% sem TPA, sinvastatina 3% sem TPA, Dexa e TPA. Os dados estão expressos em média ± E.M.P (n = 6). *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001, quando comparado ao grupo veículo e TPA (one-way ANOVA seguido de teste Newman-Keuls).

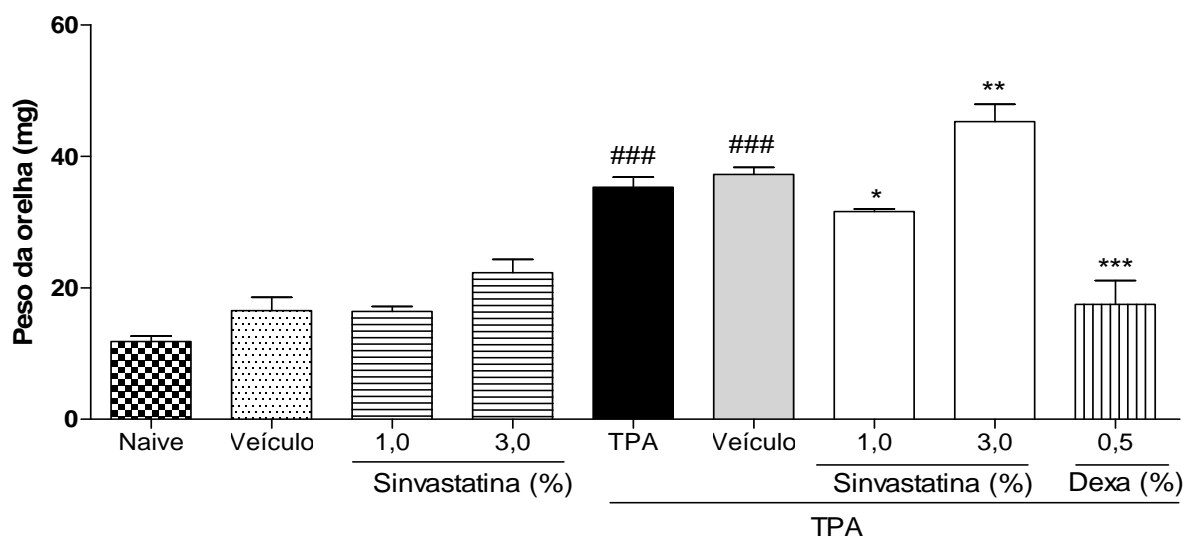


FIGURA 13 – EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NO PESO DA ORELHA NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO POR TPA

FONTE: Própria do autor (2011)

Efeito da sinvastatina em pomada no peso da orelha em modelo crônico de inflamação na orelha. O edema foi induzido com TPA (2,0 μ g/orelha), durante 9 dias alternados. Os grupos foram tratados as drogas teste 2 vezes ao dia, a partir do quinto dia. A barra quadriculada representa o grupo naive (não tratado); a barra pontilhada representa o grupo tratado com veículo; as barras com listras horizontais representam os grupos tratados com sinvastatina sem TPA; a barra preta representa o grupo tratado com TPA; a barra cinza representa o grupo tratado com veículo e TPA; as barras brancas representam os grupos tratados com sinvastatina e TPA; a barra com listra vertical representa o grupo tratado com Dexta e TPA. Cada barra representa a média \pm E.M.P (n = 6). #### P<0,001, quando comparado ao grupo naive; *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001, quando comparado ao grupo veículo e TPA (one-way ANOVA seguido de teste Newman–Keuls).

5.9 EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NA ATIVIDADE DA MPO NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA

Como foi observada uma redução do edema e peso das orelhas após a aplicação da sinvastatina 1%, decidiu-se analisar a atividade de MPO para avaliar a infiltração leucocitária

no tecido. De acordo com a FIGURA 14, não houve alterações significativas na atividade da MPO após o tratamento crônico com veículo ou sinvastatina 1% e 3%, na presença de TPA. Apenas o grupo tratado com Dexta e TPA reduziu a migração leucocitária em $79 \pm 4\%$ quando comparado ao grupo veículo e TPA.

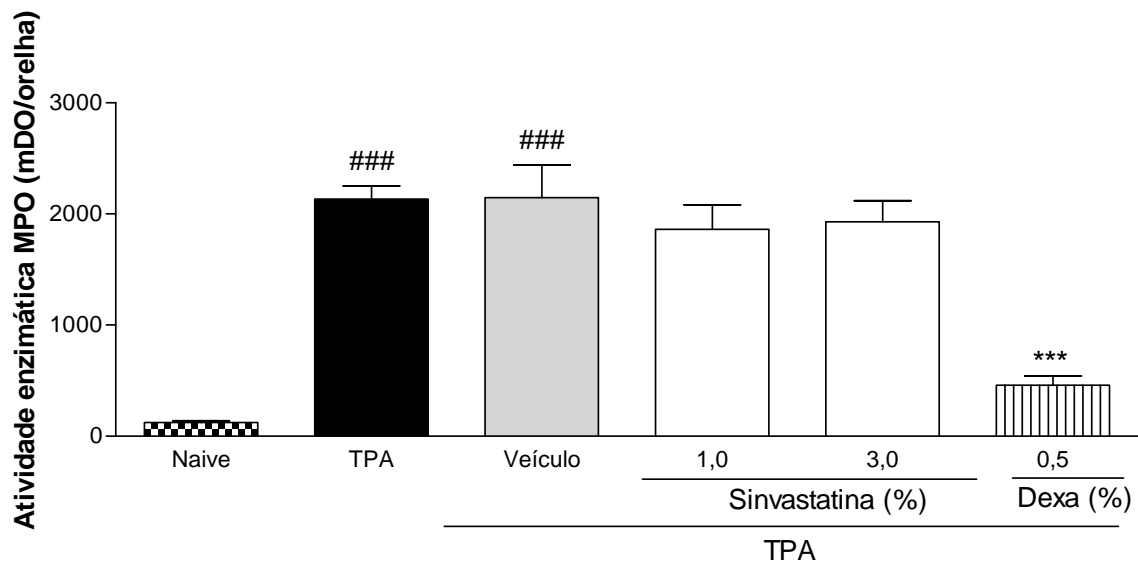


FIGURA 14 – EFEITO DA SINVASTATINA EM POMADA NA ATIVIDADE DE MPO NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO POR TPA

FONTE: Própria do autor (2011)

Efeito da sinvastatina em pomada na atividade de MPO no modelo de inflamação crônica na orelha. O edema foi induzido com TPA ($2,0 \mu\text{g}/\text{orelha}$), durante 9 dias alternados. Os grupos foram tratados com as drogas teste 2 vezes ao dia, a partir do quinto dia. A barra quadriculada representa o grupo naive (não tratado); a barra preta representa o grupo tratado com TPA; a barra cinza representa o grupo tratado com veículo e TPA; as barras brancas representam os grupos tratados com sinvastatina e TPA e a barra com listrada representa o grupo tratado com dexta e TPA. Cada barra representa a média \pm E.M.P ($n = 6$). ### $P < 0,001$, quando comparado ao grupo naive; ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo veículo e TPA (one-way ANOVA seguido de teste Newman–Keuls).

5.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM POMADA NO MODELO CRÔNICO

A fim de evidenciar os resultados obtidos nas FIGURAS 12 e 13, de edema e peso das orelhas, foi analisada a histopatologia (FIGURA 15) com as alterações causadas pelos tratamentos no tecido cutâneo e a espessura da epiderme (FIGURA 16) observada nas micrografias. A múltipla aplicação de TPA (B) promoveu um aumento do edema, da espessura da orelha (FIGURA 16) e migração celular (FIGURA 15), assim como ocorreu com o grupo tratado com TPA e veículo (C), quando comparados com o grupo naíve (A), evidenciando o veículo não é capaz de reverter o quadro inflamatório. Os grupos tratados apenas com sinvastatina 1% (E) e sinvastatina 3% (F) (sem TPA), não apresentaram alterações nos parâmetros histológicos, quando comparados ao naíve (não tratado) (A), indicando que os produtos não são capazes de promover processo inflamatório no tecido.

As pomadas de sinvastatina 1% (G) e Dexa (D) foram capazes de inibir a formação de hiperplasia epidérmica e reduziram o edema causado pela indução de TPA. Essa avaliação histopatológica foi confirmada na análise quantitativa da espessura da epiderme, sendo que a pomada de sinvastatina 1% foi capaz de reduzir a espessura em $45 \pm 2\%$ e a Dexa em $54 \pm 5\%$.

Enquanto a sinvastatina 3% (H) causou um aumento significativo de $48 \pm 19\%$, na espessura da epiderme, em relação ao grupo TPA e veículo (FIGURA 16), o que pode ser evidenciado na FIGURA 15. Este resultado deve-se à clara apresentação de hiperplasia epidérmica e edema formado.

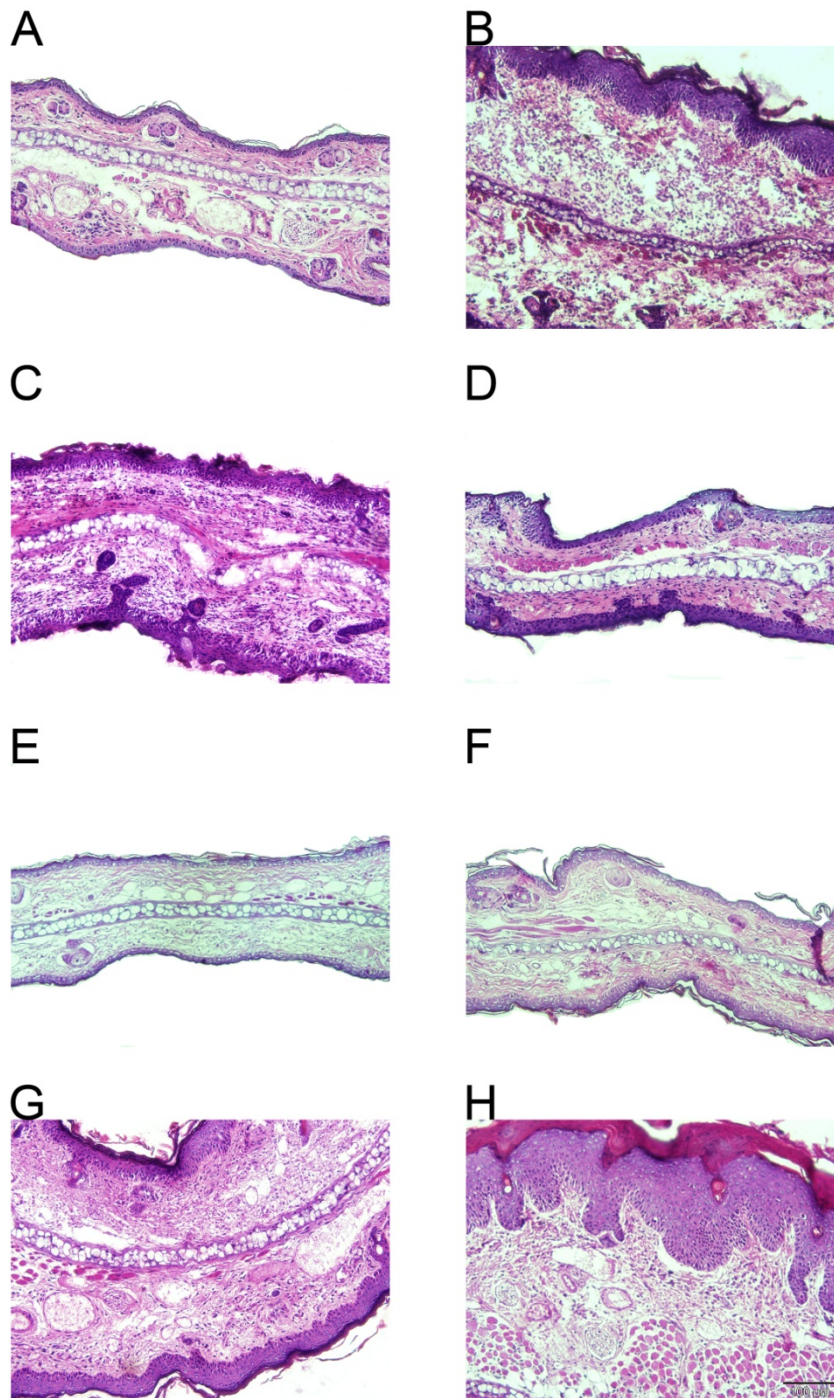


FIGURA 15 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELAS POMADAS DE
SINVASTATINA NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO POR TPA
FONTE: Própria do autor (2011)

Alterações histopatológicas (hematoxilina-eosina, 20x) causadas pelas pomadas de sinvastatina e dexametasona em pele de camundongos tratadas repetidamente com TPA. As micrografias estão apresentadas na escala de 100 μ m e representam os grupos: (A) naive (não

tratado); (B) TPA (2,0 µg/orelha); (C) TPA e veículo; (D) TPA e Dexa; (E) sinvastatina 1%; (F) sinvastatina 3%; (G) TPA e sinvastatina 1%; (H) TPA e sinvastatina 3%. As micrografias são representativas de n=3-4.

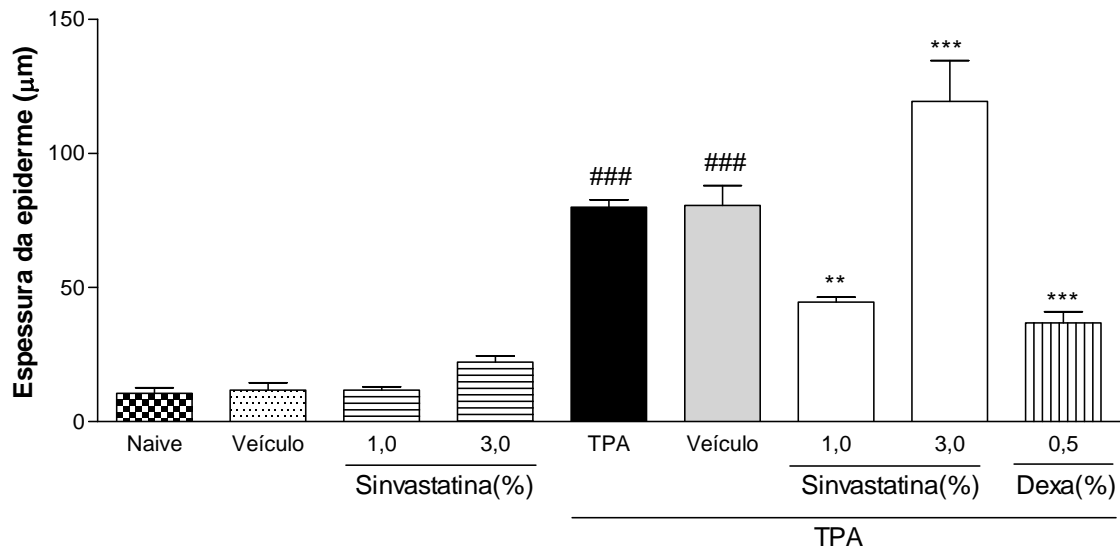


FIGURA 16 – EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE SINVASTATINA EM POMADA NA ESPESSURA DA EPIDERME NO MODELO CRÔNICO INDUZIDO POR TPA
 FONTE: Própria do autor (2011)

Efeito da aplicação tópica de sinvastatina em pomada na espessura da epiderme no modelo de inflamação crônica na orelha. A barra quadriculada representa o grupo naive (não tratado); a barra pontilhada representa o grupo tratado com veículo; as barras com listras horizontais representam os grupos tratados com sinvastatina sem TPA; a barra preta representa o grupo tratado com TPA; a barra cinza representa o grupo tratado com veículo e TPA; as barras brancas representam os grupos tratados com sinvastatina e TPA; a barra com listra vertical representa o grupo tratado com Dexa e TPA. Cada barra representa a média \pm E.M.P (n = 6). ### P<0,001, quando comparado ao grupo naive; **P<0,01 e ***P<0,001, quando comparado ao grupo veículo e TPA (one-way ANOVA seguido de teste Newman-Keuls).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado que a sinvastatina possui atividade anti-inflamatória quando aplicada topicamente em modelo animal agudo e crônico, mesmo quando incorporada em uma pomada. A fim de atingir estes resultados, os protocolos de inflamação aguda e crônica foram conduzidos com o agente flogístico TPA, o qual é amplamente utilizado e aceito para investigar os efeitos anti-inflamatórios de drogas tópicas (GÁBOR, 2000).

O edema formado a partir da indução com TPA promove alterações biológicas e bioquímicas através da modulação da atividade e expressão de PKC, que desencadeia o metabolismo de ácido araquidônico, resultando em vasodilatação, edema e infiltração de leucócitos (RAO *et al.*, 1993). O estresse oxidativo induzido pelo TPA pode ocasionar a expressão de genes de crescimento alterados através da modificação de moléculas regulatórias, alguns exemplos são os proto-oncogenes de camundongos c-myc, c-fos e c-jun (JANG; PEZZUTO, 1998).

A vasodilatação inicia com a liberação de mediadores como a histamina, serotonina e TNF- α pelos mastócitos, os quais reagem rapidamente na resposta inflamatória aguda e estimula a infiltração de neutrófilos (RAO *et al.*, 1993; BRADLEY *et al.*, 1982). Como o parâmetro MPO é bem correlacionado com o número de leucócitos polimorfonucleares infiltrados nas regiões inflamadas, sua inibição é um indicativo para a redução local de neutrófilos (AJUEBOR *et al.*, 2000; BRADLEY *et al.*, 1982). Os neutrófilos ativados são capazes de aumentar a liberação de leucotrienos e prostaglandinas na pele, e por esta razão, as moléculas que bloqueiam as enzimas responsáveis pela síntese de mediadores inflamatórios podem ser interessantes no tratamento de patologias cutâneas (TRAMPOSCH *et al.*, 1990). Assim como revisado por Namazi (2004), se considerarmos que o acúmulo de neutrófilos desempenha um papel crítico nos distúrbios inflamatórios cutâneos como as dermatites, e que as estatinas inibem a produção de mediadores inflamatórios, então, a sinvastatina pode ser uma opção de tratamento nas patologias dermatológicas.

Nossos dados do modelo agudo, da sinvastatina em acetona (0,24 – 2,4 μ M) e em pomada (1% e 3%), corroboram com esta especulação, uma vez que o tratamento tópico com sinvastatina foi capaz de interferir claramente com migração celular e edema, assim como publicado em 2006 por Otuki e colaboradores. Além disso, é possível concluir que a incorporação do fármaco em pomada não interferiu na sua atividade anti-inflamatória.

O trabalho de Diomde *et al.* (2001) fortalece também os resultados obtidos em relação à inibição do recrutamento leucocitário pela sinvastatina no modelo agudo. Os autores compararam os efeitos dos derivados de esteróis e não-esteróis a partir da biossíntese de mevalonato em um modelo animal de inflamação aguda, os camundongos receberam 3 doses repetidas de uma das três estatinas avaliadas (lovastatina, simvastatina ou pravastatina) ou esqualestatina (inibidor seletivo da síntese de um derivado de esterol), no período de 24 h, e demonstraram que o tratamento inibiu o recrutamento leucocitário e migração celular.

A partir dos resultados positivos obtidos no modelo agudo, foi realizado o modelo crônico através de aplicações repetidas de TPA na orelha dos camundongos. No experimento de modelo agudo, é analisado o efeito da droga após 6 h da aplicação do TPA, com o objetivo de avaliar se ela é capaz de reverter o edema e migração de polimorfonucleares no tecido. Já no modelo crônico, a indução de TPA é feita durante 9 dias alternados, com a finalidade de estabelecer o processo inflamatório, mediante a formação de edema, infiltração celular e a hiperproliferação da epiderme, a qual é identificada pela hiperplasia da epiderme e pode ser analisada através da sua espessura. O método do modelo crônico com TPA é bastante utilizado na avaliação de drogas para o tratamento da psoríase, pois combina infiltração de neutrófilos e hiperproliferação das células da epiderme, assim como na patologia citada (GÁBOR, 2003; HUEBER *et al.*, 2011; GROSMAN; NIELSEN, 1988).

Nos dados obtidos no modelo crônico, é possível concluir que a pomada de sinvastatina 1% apresentou efeito na inflamação crônica na orelha, pois reduziu edema e hiperproliferação epidérmica, que podem ser observados tanto nas análises quantitativas, como nas micrografias histopatológicas. A ação das estatinas foi amplamente avaliada por diversos autores, e alguns mecanismos de ação anti-inflamatória já foram estabelecidos por alguns grupos previamente a este trabalho. O impedimento da formação de mevalonato e isoprenóides GGPP e FPP, a partir da inibição da enzima HMG-CoA redutase, promove respectivamente a inibição da captação, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos B e células dendríticas, e redução da proliferação e diferenciação de células Th1 (EGESI *et al.*, 2010; GHITTONI *et al.*, 2006; NAMAZI, 2004). Considerando que a psoríase é uma patologia clássica baseada em Th1, e que a sinvastatina promove o balanço Th1/Th2, com supressão de IL-17 e IFN- γ , sugere-se que o fármaco seja eficaz no tratamento tópico, uma vez que já foi demonstrado por GLYNN *et al.* (2008), que o uso oral de sinvastatina durante 8 semanas promove a redução das placas psoriáticas, de acordo com o índice de severidade e área da psoríase (PASI) (EGESI *et al.*, 2010; KRYCZEK *et al.*, 2008; GLYNN *et al.*, 2008). Além disso, as estatinas inibem a migração leucocitária, causada pela sua ligação

ao LFA-1, redução na atividade de MMP-9 e redução no nível de MCP-1 (EGESI *et al.*, 2010; DEVARAJ *et al.*, 2006; TURNER *et al.*, 2005; KWAK *et al.*, 2000).

Já a pomada com 3% de sinvastatina prejudicou a inflamação na pele causada pelo TPA quando usada repetidamente, aumentando o edema, peso da orelha e a hiperplasia epidermal. Vários estudos das últimas décadas tem demonstrado que a epiderme é um sitio muito ativo de síntese lipídica, e, além disso, a inibição do colesterol, ácidos graxos e síntese de ceramidas bloqueia a formação do corpo lamelar (revisado por MAN *et al.*, 2006). Colesterol é o terceiro principal lipídio do estrato córneo. Apesar de as células basais serem capazes de assimilar o colesterol da circulação, a maior parte do colesterol da epiderme é sintetizado *in situ* a partir do acetato. Os níveis de colesterol para a função de barreira na permeabilidade de membrana são regulados pelo cassete ligado ao ATP subgrupo 1 membro 12 de transportador (ABCA12), um transportador de membrana responsável pelo influxo de colesterol, ativadores de receptor X hepático (LXR) e receptores de proliferação ativados por peroxisomo (PPAR) via ABCA12 (MAN *et al.*, 2006). Proksch (1995) demonstrou que drogas que reduzem lipídios como lovastatina, sinvastatina e pravastatina pela inibição da fase inicial na síntese de colesterol via inibição da HMG-CoA redutase, podem causar eczema. No entanto, outras drogas que reduzem lipídios como triparanol e diazcolesterol inibem uma fase tardia na biosíntese do colesterol, delta-24-esterol redutase, e podem induzir ictiose ou hiperqueratose palmoplantar. Já gemfibrozil que reduz triglicerídeos podem causar exacerbação da psoríase. Estas observações mostram a importância do metabolismo de lipídios em diferentes patogênese de doenças inflamatórias da pele (PROKSCH, 1995). Proksch *et al.* (1993) demonstraram previamente que a aplicação tópica da lovastatina é capaz de promover hiperproliferação epidérmica, eritema, edema e aumento na síntese de DNA, devido à inibição da enzima HMG-CoA redutase.

Após uso crônico, a redução na produção lipídica da epiderme, causada pelas estatinas, decai em 90% e provoca reparo tardio da barreira. A lesão causa um aumento na expressão dos receptores de LDL na superfície celular da camada basal, causando um acúmulo excessivo de lipídios, com desequilíbrio desta molécula e consequente formação de hiperplasia epidérmica e barreira cutânea danificada (PROKSCH *et al.*, 1993; 2008). Para justificar a hiperproliferação epidérmica, os autores acreditam que os distúrbios na barreira causam alterações na diferenciação epidérmica, em particular na expressão de filagrina, que consequentemente influencia a quebra das ligações água-filagrina e seus produtos (PROKSCH *et al.*, 2008; PROKSCH *et al.*, 2006). Com base nestas evidências, é possível concluirmos que a incorporação de sinvastatina na concentração de 1% na pomada capaz de

evitar a disfunção na barreira cutânea pela reposição de lipídios mantendo a eficácia na atividade anti-inflamatória.

Considerando que o reparo da barreira cutânea pode ser feito parcialmente com a oclusão, para prevenir a síntese de lipídios e aumento do DNA (WOOD *et al.*, 1992; GRUBAUER *et al.*, 1989), o veículo selecionado para conduzir os experimentos com sinvastatina foi uma pomada baseada em vaselina e óleo mineral. Esses componentes são oclusivos são eficazes em reduzir a perda transepidermal de água (TEWL), a qual se encontra aumentada em distúrbios patológicos como a dermatite e xerose (LYNDE, 2008). Sugere-se ainda, que a redução na síntese lipídica pode ser suprimida com a suplementação de colesterol na formulação tópica (NMAZI, 2004). Tal hipótese foi comprovada com a formulação de sinvastatina 1% em pomada.

De acordo com a revisão publicada por Namazi (2004), a ação benéfica das estatinas sobre os imunócitos compensa o seu efeito desfavorável sobre os lipídios epidérmicos. Em virtude dos resultados apresentados neste trabalho e corroborados pelos trabalhos prévios, a sinvastatina pode ser administrada topicamente, podendo ser útil no tratamento de patologias inflamatórias dermatológicas como a psoríase e dermatites, desde que incorporada no veículo correto.

7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a sinvastatina é uma droga eficaz no tratamento tópico de patologias inflamatórias cutâneas.

A incorporação de sinvastatina na dose de 1% em pomada apresentou atividade anti-inflamatória no modelo agudo.

No tratamento crônico, a pomada contendo sinvastatina 1%, também demonstra uma atividade anti-inflamatória, com redução do edema e hiperproliferação epidérmica, além de evitar os danos na barreira cutânea, os quais foram observados na pomada de sinvastatina 3%, evidenciando o possível uso clínico da sinvastatina 1%.

REFERÊNCIAS

- AARVAK, T.; CHABAUD, M.; MIOSSEC, P. et al. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. **J Immunol**, v. 162, p. 1246-1251, 1999.
- ABBAS, A.K.; LITCHMAN, A.H.; POBER, J.S. Cellular and molecular immunology. 4. ed. Philadelphia: W B Saunders, 2000.
- AJUEBOR, M.N.; SINGH, A.; WALLACE, J.L. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, p. G238-244, 2000.
- ALBANESI, C.; SCARPONI, C.; GIUSTIZIERI, M.L. et al. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, p. 329-334, 2005.
- ALON, R.; FUHLBRIGGE, R.C.; FINGER, E.B. et al. Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. **J Cell Biol**, v. 135, p. 849-865, 1996.
- AZZINI, R.G. **Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. São Paulo, 1999. 169 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- BARTER, P.J.; BREWER, H.B.J.R.; CHAPMAN, M.J. et al. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, p. 160-167, 2003.
- BERGER, C.L.; EDELSON, R. The life cycle of cutaneous T cell lymphoma reveals opportunities for targeted drug therapy. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 4, p. 609-619, 2004.
- BERMAN, M.E.; MULLER, W.A. Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). **J Immunol**, v. 154, p. 299-307, 1995.
- BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235-238, 2006.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M. et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, v. 453, p. 1051-1057, 2008.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. T(h)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat Immunol**, v. 8, p. 345-350, 2007.

BLIXT, A.; JONSSON, P.; BRAIDE, M. et al. Microscopic studies on the influence of erythrocyte concentration on the post-junctional radial distribution of leukocytes at small venular junctions. **Intern J Microcirc Clin Exp**, v. 4, p. 141-156, 1985.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M.C. et al. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **J Ethnopharmacol**, v. 130, n. 2, p. 262-266, 2010.

BONNEVILLE, M.; CHAVAGNAC, C.; VOCANSON, M. et al. Skin Contact Irritation Conditions the Development and Severity of Allergic Contact Dermatitis. **J Invest Dermatol**, v. 127, p. 1430-1435, 2007.

BOUR, H.; PEYRON, E.; GAUCHERAND, M. et al. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. **Eur J Immunol**, v. 25, p. 3006-3010, 1995.

BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; DUBBELAAR, F.E.R. et al. Phase behaviour of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. **J Lipid Res**, v. 42, p. 1759-1770, 2001.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRANDNER, J.M.; KIEF, S.; GRUND, C. et al. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. **Eur J Cell Biol**, v. 81, p. 253-263, 2002.

BRANDNER, J.M.; PROKSCH, E. Epidermal barrier function: role of tight junctions. In: ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R. **Skin Barrier**. New York: Taylor and Francis, 2006. p. 191-210.

BRAY, M.A.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; SMITH, M.J. Leukotriene B4: an inflammatory mediator in vivo. **Prostaglandins**, v. 22, p. 213-222, 1981.

BRUCKER-TUDERMAN, L. Biology of the extracellular matrix. In: BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L.; RAPINI, R, P. **Dermatology**, Edinburgh, Scotland: Mosby, p. 1483-1495, 2003.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, p. 328-340, 2005.

CARLOS, T.M.; HARLAN, J.M. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to Endothelium. **Immunol Rev**, v. 114, p. 5-28, 1990.

CARRAWAY, M.S.; WELTY-WOLF, K.E.; MILLER, D.L. et al. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. **Am J Resp Cr Care Med**, v. 167, p. 1200-1209, 2003.

CHAMPION, R.H.; BURTON, L.; BURNS, D.A. et al. **Textbook of Dermatology**. 6. ed. New York: Blackwell Science, Oxford, 1998. p. 1377-1422.

CHANG, H. Y.; CHI, J.T.; DUDOIT, S. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, n. 20, p. 12877-12882, 2002.

DAHL, M.V. Psoriasis and liquen planus. In: **Clin Immunol Dermatol**. 3 ed. New York: Mosby, 1996. p. 301-315.

DAVIES, D.E.; WICKS, J.; POWELL, R.M. et al. Airway remodeling in asthma: new insights. **J All Clin Immunol**, v. 111, p. 215-0225, 2003.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J. et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Ag Act.**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G. et al. Immune Functions of the Skin. **Clin Dermatol**, v. 19, p. 573-585, 2001.

DEMLING, R.H.; HARMS, B.; KRAMER, G. et al. Acute versus sustained hypoproteinemia and posttraumatic pulmonary edema. **Surgery**, v. 92, p. 79-86, 1982.

DEMLING, R.H.; KRAMER, G.; HARMS, B. Role of thermal injury-induced hypoproteinemia on fluid flux and protein permeability in burned and nonburned tissue. **Surgery**, v. 95, p. 136-144, 1984.

DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN, W. et al. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. **Science**, v. 230, p. 330-332, 1985.

DEVARAJ, S.; CHAN, E.; JIALAL, I. Direct demonstration of an antiinflammatory effect of simvastatin in subjects with the metabolic syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, p. 4489-96, 2006.

DIEU-NOSJEAN, M.C.; MASSACRIER, C.; HOMEY, B. et al. Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. **J Exp Med.**, v. 192, p. 705-718, 2000.

DIOMDE, L.; ALBANI, D.; SOTTOCORNO, M. et al. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 21, p. 1327-1332, 2001.

DLUGOSZ, A.A.; YUSPA, S.H. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. **J Cell Biol**, v. 120, p. 217-225, 1993.

DOWNING, D.T.; STEWART, M.E.; WERTZ, P.W. et al. Skin lipids: an update. **J Invest Dermatol**, v. 88, p. 2s-6s, 1987.

EBERHARD, Y.; ORTIZ, S.; RUIZ LASCANO, A. et al. Up-regulation of the chemokine CCL21 in the skin of subjects exposed to irritants. **BMC Immunol**, v. 26, n. 5, p. 7, 2004.

ENDO A. The Discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J Lipid Res.**, v. 33, n. 11, p. 1569-1582, 1992.

ENK, A.H.; KATZ, S.I. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 1398-1402, 1992.

FEINGOLD, K.R.; MAC-QIANG, M.; PREDSCH, E. et al. The lovastatin-treated rodent: a new model of barrier disruption and epidermal hyperplasia. **J Invest Dermatol**, v. 96, p. 201-209, 1991.

FERNANDEZ, H.N.; HENSON, P.M.; OTANI, A. et al. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. **J Immunol**, v. 120, p. 109-115, 1978.

FREINKEL, R.K.; WOODLEY, D.T. **The biology of skin**. New York: Parthenon Publishing, 2001. p. 113-131.

FRIEDL, H.P.; TILL, G.O.; TRENTZ, O. et al. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. **Am J Pathol**, v. 135, p. 203-217, 1989.

FUKUNAGA, A.; KHASKHELY, N.M.; SREEVIDYA, C.S. et al. Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. **J Immunol**, v. 180, p. 3057–3064, 2008.

GÁBOR, M. **Ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÁBOR, M. Models of Acute Inflammation in the Ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D.A. **Methods in Molecular Biology**, v. 225: Inflammation Protocols. Humana Press Inc: Totowa, NJ, 2003. p. 129-137.

GHITTONI, R.; NAPOLITANI, G.; BENATI, D. et al. Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 11, p. 2885-93, 2006.

GLYNN, S.A.; O'SULLIVAN, D.; EUSTACE, A.J. et al. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. **BMC Cancer**, v. 16, n. 8, p. 9, 2008.

GOLDSMITH, L.A. **Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 660-696.

GROSMAN, N.; NIELSEN, K.A. The influence of tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) on histamine release from isolated rat mast cells. **Ag Act**, v. 24, p. 1-2, 1988.

GRUBAUER, G.; ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R. Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. **J Lipid Res**, v. 30, p. 323-333, 1989.

HARDMAN, M.J.; BYRNE, C. Skin Structural Development. In: ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R. **Skin Barrier**, Nova Iorque, Taylor & Francis Group, v. 17, p. 273-288, 2006.

HARRIS, I.R.; FARRELL, A.M.; GRUNFELD, C. et al. Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key enzymes of cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in the epidermis. **J Invest Dermatol**, v. 109, p. 783-787, 1997.

HARRIS, I.R.; FARRELL, A.M.; HOLLERAN, W.M. et al. Parallel regulation of sterol regulatory element binding protein-2 and the enzymes of cholesterol and fatty acid synthesis but not ceramide synthesis in cultured human keratinocytes and murine epidermis. **J Lipid Res**, v. 39, p. 412-422, 1998.

HEUFLER, C.; TOPAR, G.; GRASSEGER, A. et al. Interleukin-7 is produced by murine and human keratinocytes. **J Exp Med**, v. 178, p. 1109-1114, 1993.

HONARI, S. Topical therapies and antimicrobials in the management of burn wounds. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 16, p. 1-11, 2004.

HUBER, M.; BRUSTLE, A.; REINHARD, K. et al. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, p. 20846-20851, 2008.

HUBER, M.; RETTLER, I.; BERNASCONI, K. et al. Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. **Science**, v. 267, p. 525-528, 1995.

HUEBER, A.J.; ALVES-FILHO, J.C.; ASQUITH, D.L. et al. IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 8, p. 2229-37, 2011.

HUNZIKER, T.; BRAND, C.U.; KAPP, A. et al. Increased levels of inflammatory cytokines in human skin lymph derived from sodium lauryl sulphate-induced contact dermatitis. **Br J Dermatol**, v. 127, p. 254-257, 1992.

IAROVINSKII, B.G.; ZUROCHKA, A.V.; EBERT, L. et al. Status of the regulatory function of neutrophils in patients with atopic dermatitis. **Biull Eksp Biol Med**, v. 120, p. 318-319, 1995.

IRVINE, A.D.; MCLEAN, W.H. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. **J Invest Dermatol**, v. 126, p. 1200-1202, 2006.

JAGER, A.; KUCHROO, V.K. Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. **Scand J Immunol**, v. 72, p. 173-184, 2010.

JANEWAY, C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 54, p. 1-13, 1989.

JENSEN, J.M.; SCHUTZE, S.; FORL, M. et al. Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. **J Clin Invest**, v. 104, p. 1761-1770, 1999.

JUNGERSTED, J.M.; HELLGREN, L.I.; JEMEC, G.B.E. et al. Lipids and skin barrier function - a clinical perspective. **Contact Dermatitis**, v. 58, p. 255-262, 2008.

KANDA, H.; YOKOTA, K.; KOHNO, C. et al. Effects of low dosages on rheumatoid arthritis through reduction of Th1/Th2 and CD4/CD8 ratios. **Mod Rheumatol**, v. 17, n. 5, p. 364-368, 2007.

KAST, R.; FURSTENBERGER, G.; MARKS, F. Phorbol ester TPA and bradykinin-induced arachidonic acid release from keratinocytes is catalyzed by a cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). **J Invest Dermatol**, v. 101, 567-572, 1993.

KEHREN, J.; DESVIGNES, C.; KRASTEVA, M. et al. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. **J Exp Med**, v. 189, p. 779-786, 1999.

KLECHEVSKY, E.; MORITA, R.; LIU, M. et al. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. **Immunity**, v. 29, p. 497-510, 2008.

KOBASHIGAWA, J.A.; KATZNELSON, S.; LAKS, H. et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. **N Engl J Med**, v. 333, p. 621-627, 1995.

KRASTEVA, M.; KEHREN, J.; HORAND, F. et al. Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. **J Immunol**, v. 160, p. 1181-1190, 1998.

KRYCZEK, I.; BRUCE, A.T.; GUDJONSSON, J.E. et al. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. **J Immunol**, v. 181, n. 7, p. 4733-41, 2008.

KUPPER, T.S. Biology of the interleukin-1 receptor. **J Invest Dermatol**, v. 94, p. 146S-150S, 1990.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; MYIT, S. et al. Statins as a newly recognized type of imunomodulator. **Nat Med**, v. 6, n. 12, p. 1399-1402, 2000.

LAJTHA, L.G. **Stem cell concepts**: Differentiation. v. 14, p. 23-34, 1979.

LEPOITTEVIN, J.; LEBLOND, I. Hapten-peptide T cell receptor interactions: molecular basis for recognition of haptens by T lymphocytes. **Eur J Dermatol**, v. 7, p. 151-4, 1997.

LEUNG, B.P.; SATTAR, N.; CRILLY A et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. **J Immunol**, v. 170, n. 3, p. 1524-1530, 2003.

LIEW, F.Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunol Letters**, v. 85, p. 131-134, 2003.

LYNDE, C. Moisturizers for the treatment of inflammatory skin conditions. **J Drugs Dermatol**, v. 7, n. 11, p. 1038-1043, 2008.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: “la raison d’etre” of the epidermis. **J Invest Dermatol**, v. 121, p. 231-242, 2003.

MAN, M.Q.; CHOI, E.H.; SCHMUTH, M. et al. Basis for improved permeability barrier homeostasis induced by PPAR and LXR activators: liposensors stimulate lipid synthesis, lamellar body secretion, and post-secretory lipid processing. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 2, p. 386-92, 2006.

MANABE, M.; O’GUIN, W.M. Keratohyalin, trichohyalin and keratohyalin-trichohyalin hybrid granules: an overview. **J. Dermatol**, v. 19, n. 11, p. 749-55, 1992.

MAO-QIANG, M.; FEINGOLD, K.R.; ELIAS, P.M. Inhibition of cholesterol and sphingolipid synthesis causes paradoxical effects on permeability barrier homeostasis. **J Invest Dermatol**, v. 101, p. 185-190, 1993.

MARICICH, S.M.; WELLNITZ, S.A.; NELSON, A.M. et al. Merkel Cells Are Essential for Light-Touch Responses. **Science**, v. 324, p. 1580, 2009.

MARKS, J.G.; ELSNER, P.; DELEO, V. Allergic and irritant contact dermatitis. In: **Contact and Occupational Dermatology**. St Louis: Mosby, 2002. p. 3-12.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-265, 2009.

MATUSEVICIUS, D. et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 5, p. 101-104, 1999.

MCFADDEN, J.P.; HOLLOWAY, D.B.; WHITTLE, E.G. et al. Benzalkonium chloride neutralizes the irritant effect of sodium dodecyl sulfate. **Contact Dermatitis**, v. 43, p. 264-266, 2000.

MILLER, L.S.; MODLIN, R. L. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. **J Invest Dermatol**, v. 127, p. 262-263, 2007.

MONCADA, S. PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharm Rev**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y. et al. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 71, p. 1331-1336, 2006.

NAMAZI, M.R. Statins: novel additions to the dermatologic arsenal? **Exp Dermatol**, v. 13, p. 337-339, 2004.

NEMES, Z.; STEINERT, P.M. Bricks and mortar of the epidermal barrier. **Exp Mol Med**, v. 31, p. 5-19, 1999.

NESTLE, F.O.; MEGLIO, P.D.; QIN, J-Z. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, p. 679-691, 2009.

NESTLE, F.O.; NICKOLOFF, B.J. Deepening our understanding of immune sentinels in the skin. **J Clin Invest**, v. 117, p. 2382-2385, 2007.

NEUHAUS, O.; STRASSER-FUCHS, S.; FAZEKAS, F. et al. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. **Neurology**, v. 59, p. 990-997, 2002.

NEZIC, L.; SKRBIC, R.; DOBRIC, S. et al. Simvastatin and indomethacin have similar anti-inflammatory activity in a rat model of acute local inflammation. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, p. 185-191, 2009.

NEZIC, L.; SKRBIC, R.; DOBRIC, S. et al. Effect of simvastatin on proinflammatory cytokines production during lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. **Gen Physiol Biophys**, v. 28, p. 119-126, 2009.

NICKOLOFF, B.J.; GRIFFITHS, C.E. Aberrant intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by hair-follicle epithelial cells and endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) by vascular cells are important adhesion-molecule alterations in alopecia areata. **J Invest Dermatol**, v. 96, n. 5, p. 91S-92S, 1991.

OLOFSSON, S.O.; STILLEMARCK-BILLTON, P.; ASP, L. Intracellular assembly of VLD: two major steps in separate cell compartments. **Trends Cardiovasc Med**, v. 10, p. 338-45, 2000.
OREN, A.; GANZ, T.; LIU, L.; MEERLOO, T. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. **Exp Mol Pathol**, v. 74, p. 180-182, 2003.

OTUKI, M.F.; PIETROVSKI, E.F.; CABRINI, D.A. Topical simvastatin: preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. **J Dermatol Sci**, v. 44, p. 45-47, 2006.

OWENS, D. M.; WATT, F.M. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. **Nat Rev Cancer**, v. 3, p. 444-451, 2003.

PALMER, C.N.; IRVINE, A. D.; TERRON-KWIATKOWSKI, A. et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. **Nat Genet**, v. 38, p. 441-446, 2006.

PARK, H. I.; KOSMADAKI, M.; YAAR, M. et al. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 9, p. 1493-506, 2009.

PASTORE, S.; MASCIA, F.; MARIOTTI, F. et al. Chemokine networks in inflammatory skin diseases. **Eur J Dermatol**, v. 14, p. 203-208, 2004.

PERRY, M.A.; GRANGER, D.N. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. **J Clin Invest**, v. 87, p. 1798-1804, 1991.

PRUEFER, D.; MAKOWSKI, J.; SCHNELL, M. et al. Simvastatin inhibits inflammatory properties of Staphylococcus aureus alpha-toxin. **Circulation**, v. 106, p. 2104-2110, 2002.

PROKSCH, E. Antilipemic drug-induced skin manifestations. **Hautarzt**, v. 46, n. 2, p. 76-80, 1995.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J-M. The skin: an indispensable barrier. **Exp Dermatol**, v. 17, p. 1063-1072, 2008.

PROKSCH, E.; ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in murine epidermis. Modulation of enzyme content and activation state by barrier requirements. **J Clin Invest**, v. 85, p. 874-882, 1990.

PROKSCH, E.; FEINGOLD, K.R.; ELIAS, P.M. Epidermal HMG CoA reductase activity in essential fatty acid deficiency: barrier requirements rather than eicosanoid generation regulate cholesterol synthesis. **J Invest Dermatol**, v. 99, p. 216-220, 1992.

PROKSCH, E.; FÖLSTER-HOLST, R.; JENSEN, J.M. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. **J Dermatol Sci**, v. 43, p. 159-169, 2006.

PROKSCH, E.; HOLLERAN, W.M.; MENON, G.K. et al. Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. **Br J Dermatol**, v. 128, p. 473-482, 1993.

PUIGNERO, V.; QUERALT, J. Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. **Inflammation**, v. 21, p. 431-442, 1997.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 723-741, 1993.

RAO, P.; KNAUS, E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **J Pharm Pharm Sci**, v. 11, p. 81s-110s, 2008.

ROOP, D. Defects in the barrier. **Science**, v. 267, p. 474-475, 1995.

ROWLAND, T.L.; MCHUGH, S.M.; DEIGHTON, J. et al. Differential effect of thalidomide and dexamethasone on the transcription factor NF-kappa B. **Int Immunopharmacol**, v. 1, p. 49-61, 2001.

SAINT-MEZARD, P.; BERARD, F.; DUBOIS, B. et al. The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. **Eur J Dermatol**, v. 14, p. 131-138, 2004.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of prostaglandin-H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 57, p. 119-131, 1999.

SCHIFFMANN, E.; CORCORAN, B.A.; WAHL, S.M. N-Formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, p. 1059-1062, 1975.

SCHOLZ, K.; FURSTENBERGER, G.; MULLER-DECKER, K. et al. Differential expression of prostaglandin-H synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes in vivo and in vitro. **Biochem J.**, v. 309, n. 1, p. 263-269, 1995.

SCHREINER, V.; GOORIS, G.S.; PFEIFFER, S. et al. Barrier characteristics of different human skin types investigated with x-ray diffraction, lipid analysis and electron microscopy imaging. **J Invest Dermatol**, v. 114, p. 654-660, 2000.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SLODOWNIK, D.; LEE, A.; NIXON, R. Irritant contact dermatitis: A review. **Australas J Dermatol**, v. 49, p. 1-11, 2008.

SMITH PEASE, C.K.; BASKETTER, D.A.; PATLEWICZ, G.Y. Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism. **Clin Exp Dermatol**, v. 28, p. 177-183, 2003.

SMITH, F.J.; IRVINE, A.D.; TERRON-KWIATKOWSKI, A. et al. Loss of function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. **Nat Genet**, v. 38, p. 337-342, 2006.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J Cell Sci**, v. 117, p. 667-675, 2004.

SPLETTSTOESSER, W.D.; SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes—the enemy within. **Microsc Res Tech**, v. 57, p. 441-455, 2002.

STAMPFER, M.J.; KRAUSS, R.M.; MA, J. et al. A prospective study of triglyceride level, low density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. **JAMA**, v. 276, p. 882-888, 1996.

STANLEY, P.L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol**, v. 4, p. 262-271, 1991.

STOITZNER, P. *et al.* Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc. Natl Acad Sci USA*, v. 103, p. 7783-7788, 2006.

SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Anal Biochem**, v. 132, p. 345-352, 1983.

TABERNERO, A.; SCHNEIDER, F.; POTENZA, M.A. *et al.* Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immuno-localization and influence on vascular tone. **Intensive Care Med**, v. 29, p. 262-270, 2003.

TEUNISSEN, M.B.; KOOMEN, C.W.; DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 111, p. 645-649, 1998.

THUNE, P.; NILSEN, T.; HANSTAD, I. K. et al. The water barrier function of the skin in relation to the water content of stratum corneum, pH and skin lipids. The effect of alkaline soap and syndet on dry skin in elderly, non-atopic patients. **Acta Derm Venereol**, v. 68, p. 277-283, 1988.

TOBIN, D.J. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, p. 52-67, 2005.

TOUTOUZAS, K.; DRAKOPOULOU, M.; SKOUMAS, I. et al. Advancing therapy for hypercholesterolemia. **Expert Opin Pharmacother**, v. 11, n. 10, p. 1659-1672, 2010.

TRAMPOSCH, K.M.; ZUSI, F.C.; MARATHE, S.A. et al. Biochemical and pharmacological properties of a new topical anti-inflammatory compound, 9-phenylnonanohydroxamic acid (BMV 30094). **Agents Actions**, v. 30, p. 443-450, 1990.

TSURUOKA, H.; KHOVIDHUNKIT, W.; BROWN, B.E. et al. Scavenger receptor class B type I is expressed in cultured keratinocytes and epidermis. **J Biol Chem**, v. 277, p. 2916-2922, 2002.

TURNER, N.A.; O'REGAN, D.J.; BALL, S.G.; PORTER, K.E. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA levels. **FASEB J.**, v. 19, n. 7, p. 804-806, 2005.

UITTO, J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Ageassociated alterations in collagen and elastin. **Clin Geriatr Med**, v. 5, n. 1, p. 127-47, 1989.

VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, p. 342-350, 2001.

VAN DEN WIJNGAARD, R.; WANKOWICZ-KALINSKA, A.; LE POOLE, C. et al. Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA⁺ T cells at the perilesional site. **Lab Invest**, v. 80, n. 8, p. 1299-309, 2000.

VEILLARD, N.R.; MACH, F. Statins: the new aspirin? **Cell Mol Life Sci**, v. 59, p. 1771-1786, 2002.

WANG, H.Q.; KIM, M.P.; TIANO, H.F. et al. Protein kinase C- α coordinately regulates cytosolic phospholipase A(2) activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. **Mol Pharmacol**, v. 59, p. 860-866, 2001.

WANG, X.P.; SCHUNCK, M.; KALLEN, K.J. The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. **J Invest Dermatol**, v. 123, p. 124-131, 2004.

WARTEWIG, S.; NEUBERT, R.H.H. Properties of ceramides and their impact on stratum corneum structures: a review. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 20, p. 220-229, 2007.

WERTZ, P.W. Epidermal lipids. **Semin Dermatol**, v. 11, p. 106-113, 1992.

WERZ, O.; KLEMM, J.; SAMUELSSON, B. et al. Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 97, p. 2487-2495, 2001.

WICKETT, R.R.; VISSCHER, M.O. Structure and function of the epidermal barrier. **Am J Infect Control**, v. 34, p. 98-110, 2006.

WOOD, L.C.; JACKSON, S.M.; ELIAS, P.M.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K.R. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. **J Clin Invest**, v. 90, p. 482-487, 1992.

YAN, X.; OWENS, D.M. The Skin: A Home to Multiple Classes of Epithelial Progenitor Cells. **Stem Cell Rev**, v. 4, p. 113-118, 2008.

YOSHIDA, Y.; MORITA, K.; MIZOGUCHI, A.; IDE, C.; MIYACHI, Y. Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. **Arch Dermatol Res**, v. 293, p. 239-244, 2001.